



# Identification de nouveaux facteurs de régulation physiopathologique de la NADPH oxydase du neutrophile : Importance de mTOR, de la dégradation de NOX2 via l'élastase et perspectives de traitement des déficits induits au cours de la cirrhose alcoolique

Loïc Rolas

## ► To cite this version:

Loïc Rolas. Identification de nouveaux facteurs de régulation physiopathologique de la NADPH oxydase du neutrophile : Importance de mTOR, de la dégradation de NOX2 via l'élastase et perspectives de traitement des déficits induits au cours de la cirrhose alcoolique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T045 . tel-01369389

**HAL Id: tel-01369389**

**<https://theses.hal.science/tel-01369389>**

Submitted on 21 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD  
ÉCOLE DOCTORALE 419 :  
BIOSIGNE

Laboratoire : INSERM UMR 1149, CNRS ERL 8252, Centre de Recherche sur  
l'Inflammation

Equipe : « Phagocytes, NADPH oxydase et Immunogénétique dans l'inflammation  
systémique »

## THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ  
par

**Loïc ROLAS**

Identification de nouveaux facteurs de régulation  
physiopathologique de la NADPH oxydase du neutrophile :  
Importance de mTOR, de la dégradation de NOX2 via l'élastase  
et perspectives de traitement des déficits induits au cours de  
la cirrhose alcoolique

Date de soutenance : 21/09/2015

**Composition du jury :**

Président du jury :	Mme Corinne DUPUY	DR CNRS (UMR 8200)
Rapporteurs :	M. Jean-Michel SALLENAVE M. Olivier MEILHAC	Professeur (UMR 1152) DR INSERM (UMR 1188)
Examineurs :	Mme Sylvie CHOLLET-MARTIN M. Richard MOREAU	Professeure (UMR 996) DR INSERM (UMR 1149)
Directeur de thèse :	M. Axel PERIANIN	DR CNRS (UMR 1149)

# Résumé

La production d'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par le complexe NADPH oxydase 2 (NOX2) du polynucléaire neutrophile (explosion oxydative, EO) contribue à l'élimination d'agents pathogènes. Cette fonction de défense est stimulée par divers agents pro-inflammatoires, notamment par des peptides bactériens (fMLP), qui déclenchent une cascade de signalisation impliquant différentes protéines kinases (PKC, AKT, MAP-Kinases) et aboutissant à l'activation de la NOX2 (également nommée gp91<sup>phox</sup>), le cœur catalytique du complexe. Dans cette thèse, j'ai identifié la protéine kinase mTOR comme un nouvel effecteur majeur de l'EO dans les neutrophiles sains et j'ai comparé son mode d'action transductionnel dans les neutrophiles de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée en vue de comprendre leur grande susceptibilité aux infections bactériennes.

Une contribution majeure de mTOR dans la production d' $O_2^-$  induite par le fMLP a pu être démontrée à l'aide de son antagoniste spécifique, le médicament Rapamycine et par une approche antisense. mTOR agit en amont de la p38-MAPK qui phosphoryle la p47phox, un composant majeur du complexe NADPH oxydase. Dans les neutrophiles de patients cirrhotiques, l'EO est fortement défaillante, associée à un défaut d'activation de la voie p38-MAPK/p47phox(S345). Ce déficit d'EO est aggravé par la Rapamycine. Les neutrophiles de patients cirrhotiques présentent également un déficit d'expression de la gp91<sup>phox</sup> (NOX2), p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et mTOR. Un déficit d'expression de la NOX2 a pu être reproduit en traitant les neutrophiles sains par le fMLP ou du plasma des patients. De plus, ce phénomène met en jeu une dégradation protéolytique insoupçonnée de la gp91<sup>phox</sup> impliquant l'élastase. Enfin, la déficience fonctionnelle des neutrophiles de patients a pu être corrigée dans des neutrophiles isolés et dans du sang total des patients cirrhotiques à l'aide d'un agoniste de récepteurs « Toll-like receptor (TLR) » qui agit en favorisant la transcription du gène de la gp91phox et sa synthèse protéique.

En conclusion, mTOR émerge comme un nouvel effecteur transductionnel majeur de l'EO des neutrophiles, favorisant l'activation de la voie p47<sup>phox</sup>/gp91<sup>phox</sup> via les MAPK. Cette nouvelle voie de signalisation est fortement impactée au cours de la cirrhose alcoolique, ce qui favorise la susceptibilité des patients aux infections bactériennes. Bien que notre étude soulève ainsi des inquiétudes quant à l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR chez les patients immunodéprimés, elle suscite par ailleurs la perspective de pouvoir corriger les déficits fonctionnels des neutrophiles à l'aide d'agents capables de stimuler des TLR intracellulaires.

Mots clés : Neutrophile, NADPH oxydase, NOX2, mTOR, signalisation, dégradation, élastase,

# REMERCIEMENTS

Les travaux décrits dans ce rapport ont été effectués dans le Centre de Recherche sur l'inflammation (CRI) de la Faculté de Médecine Xavier Bichat (INSERM U1149), sous l'encadrement du **Docteur Axel Périanin**. Je tiens tout d'abord à le remercier sincèrement pour m'avoir permis d'effectuer ce travail et pour m'avoir épaulé jusqu'au bout de ce projet.

Je remercie **Docteur Corinne Dupuy** pour avoir accepté de présider ce jury cette thèse

Je remercie **Docteur Olivier Meilhac** et **Professeur Jean-Michel Sallenave**, qui ont pris sur leur temps afin d'être rapporteur de cette thèse

Je remercie **Professeure Sylvie Chollet-Martin** et **Docteur Richard Moreau** qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

*Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des personnes qui ont collaboré à ce travail :*

Mes amis **Soumeya Hadjoudj**, **Nesrine Makhezer** et **Abdelali Boussif** qui ont activement collaboré à ce travail. Mais aussi le docteur **Emmanuel Weiss** et le **Département d'Anesthésie Réanimation** de l'Hôpital Beaujon, qui nous ont fourni les précieux échantillons sanguins de patients atteints de cirrhose hépatique

*Je souhaite ensuite remercier tous les membres de l'équipe et particulièrement :*

Les chercheurs titulaires de l'équipe, docteur **Jamel El-Benna**, professeur **Marie-Anne Gougerot-Pocidalo**, docteur **Pham My-Chan Dang**, docteur **Jean-Claude Marie**, docteur **Eric Chastre** et docteur **Larissa Kotelevets** pour leur précieuse aide scientifique et leur assistance en tout genre. Je n'oublie pas mes collègues de laboratoire et plus particulièrement **Sahra Amel Belambri**, **Viviana Marzaioli**, **Michelle Fay**, **Hanane Boukemara** et **Kaouthar Boudiaf** qui sont devenue avec le temps de véritables amies avec qui on a pu partager bien plus que du travail de recherche. Je garde une place particulière pour, **Yamina Khichane**, **Imen Elatrech**, **Margarita Hurtado-Nedelec**, **Anaïs Gardette**, **Hasnaa Maksouri**, **Saoussen Tobji**, **Karama Makni-Maalej**, **Tarek Boussetta**, **Maya Debbabi**, **Pia Chedid**, **Riad Arabi-Derkawi** et toutes les personnes que j'aurais malencontreusement oubliées.

*Je tiens également à remercier mes collègues de l'unité 1149*

Pour leur assistance et leur aide, en particulier **Celia Lydia Madjene**, **Luca Daneli**, **Batoul Mahfouz**, **Sanae Ben Mkaddem**, et **Asma Kassas**

Je remercie enfin le labex INFLAMEX qui a financé ce travail



# Table des matières

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>12</b>
<b>II.</b>	<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>14</b>
<b>1</b>	<b>- Le polynucléaire neutrophile : Origine, devenir et fonctions principales.....</b>	<b>15</b>
1.1	Origine et devenir du neutrophile.....	15
1.2	Contenu des granules du neutrophile.....	17
1.3	Principales étapes de l'activité anti-infectieuse rapide du neutrophile.....	19
1.4	La production de cytokines.....	31
1.5	Autres fonctions liées au neutrophile .....	32
1.6	Apoptose du neutrophile et résolution de l'inflammation .....	34
<b>2</b>	<b>- Les récepteurs liés aux fonctions de défense du neutrophile.....</b>	<b>35</b>
2.1	Les « Pattern Recognition Receptor » (PRR) du neutrophile.....	35
2.2	Les « Toll-Like » receptor (TLR).....	36
2.3	Les récepteurs chimiotactiques.....	40
2.4	Les formyl Peptide Receptor (fPR) .....	43
<b>3</b>	<b>- Les complexes NADPH oxydase.....</b>	<b>50</b>
3.1	Historique et description.....	50
3.2	Les différentes familles de NADPH oxydase.....	50
3.3	La NADPH Oxydase des neutrophiles : Structure et composants.....	52
3.4	L'activation de la NOX2 .....	56
3.5	Les pathologies associées à la dérégulation de l'activité de la NOX2 .....	62
<b>4</b>	<b>- Voies de signalisation du fPR pour l'activation de la NOX2 du neutrophile.....</b>	<b>66</b>
4.1	La signalisation intracellulaire : Définition .....	66
4.2	Les protéines G : Déclencheurs de la transduction du signal .....	68
4.3	Les phospholipases .....	71
4.4	La voie PI3K / AKT .....	74
4.5	Les MAP-Kinases.....	76
4.6	Les tyrosine kinases.....	79
4.7	Les protéine kinases C.....	80
<b>5</b>	<b>- La protéine “mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)”.....</b>	<b>83</b>

5.1	Structure de mTOR et de ses complexes .....	84
5.2	Fonctions et substrats de mTORC1 .....	87
5.3	Fonctions de mTORC2 .....	92
5.4	Localisation et expression .....	94
5.5	L'activation du complexe mTORC1 .....	95
5.6	Les voies d'activation de mTORC1 .....	99
5.7	Voies d'activation de mTORC2 et substrats .....	100
5.8	mTOR, entre inflammation et cancer .....	102
5.9	mTOR dans les neutrophiles.....	105
5.10	mTOR : Une cible thérapeutique.....	108
<b>6</b>	<b>- Neutrophiles, cirrhose hépatique alcoolique et maladies infectieuses .....</b>	<b>115</b>
6.1	Introduction .....	115
6.2	Généralités sur le foie .....	115
6.3	La cirrhose hépatique.....	117
6.4	Rôle néfaste de l'alcool .....	119
6.5	Les neutrophiles dans la cirrhose hépatique alcoolique .....	120
6.6	Traitement de la cirrhose hépatique.....	122
6.7	Les neutrophiles dans d'autres pathologies inflammatoires.....	123
<b>III.</b>	<b>ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>128</b>
<b>1</b>	<b>- Objectifs de recherche.....</b>	<b>129</b>
<b>2</b>	<b>- Résultats expérimentaux.....</b>	<b>131</b>
2.1	Publication 1 : L'inhibition de mTOR par la rapamycine aggrave la déficience d'explosion oxydative des neutrophiles de patients cirrhotiques .....	131
2.2	Manuscrit 2 : L'élastase induit la diminution d'expression de la NADPH oxydase de neutrophiles de patients cirrhotiques. Restauration via l'activation du TLR8.....	141
2.3	Résultats annexes des manuscrits 1 et 2 .....	169
2.4	Manuscrit 3 : Défaillance de la libération de MPO des PN de patients cirrhotiques .....	179
2.5	Manuscrit 4 : Le virus O'nyong-nyong interfère avec la signalisation du fPR .....	198
<b>3</b>	<b>- Discussion générale.....</b>	<b>218</b>
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONS GENERALES .....</b>	<b>234</b>
<b>V.</b>	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>236</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCES.....</b>	<b>238</b>

## Liste des schémas

<b>Schéma 1 :</b> Les différentes étapes de maturation du neutrophile (d'après Bainton, 1986).....	16
<b>Schéma 2 :</b> Régulation de l'exocytose des granules (adapté d'après Lacy et al, 2006).....	25
<b>Schéma 3 :</b> Les cytokines produites par les neutrophiles (Adapté d'après Tecchio et al, 2014) .....	31
<b>Schéma 4 :</b> Les PRR à la surface du neutrophile (adapté à partir de Christina et al, 2013).....	36
<b>Schéma 5 :</b> Structure des TLR .....	36
<b>Schéma 6 :</b> Répartition subcellulaire et ligands des TLR (Adapté de InvivoGen, 2015) .....	37
<b>Schéma 7 :</b> Classification des RCPG (Extrait de Bockaert et Pin, 1999) .....	42
<b>Schéma 8 :</b> Activation des RCPG (adapté de Wikimedia Commons, 2010) .....	43
<b>Schéma 9 :</b> Structure primaire et 3D prédictive du formyl-peptide-receptor fPR1 (adapté à partir de <a href="http://atlasgeneticsoncology.org">http://atlasgeneticsoncology.org</a> ).....	44
<b>Schéma 10 :</b> Homo et hétérodimérisation de fPR1 et 2 (d'après Janos G, 2013) .....	48
<b>Schéma 11 :</b> La famille des protéines NOX (d'après Bedard et Krause 2007).....	51
<b>Schéma 12 :</b> Modèle structural de la gp91phox.....	53
<b>Schéma 13 :</b> Modèle structural de la p22phox.....	54
<b>Schéma 14 :</b> Les domaines de la p47phox (d'après Groemping Y et Rittinger K, 2005).....	54
<b>Schéma 15 :</b> Les domaines de la p67phox (d'après Groemping Y et Rittinger K, 2005).....	55
<b>Schéma 16 :</b> Les domaines de la p40phox (d'après Groemping Y et Rittinger K, 2005).....	55
<b>Schéma 17 :</b> Modèle d'interaction entre les composants cytosoliques de la NADPH oxydase (d'après Lapouge K et al, 2002) .....	57
<b>Schéma 18 :</b> Les sites de phosphorylation de la p47phox (d'après El-Benna J et al, 2009).....	57
<b>Schéma 19 :</b> Interaction entre les éléments de la NADPH oxydase activée (d'après Krause et al 2007).....	60
<b>Schéma 20 :</b> La transduction du signal après l'activation du fPR1 (Adapté à partir de Doward DA et al, 2015).....	67
<b>Schéma 21 :</b> Activation des RCPG (Jähnichen S, Wikipedia).....	69
<b>Schéma 22 :</b> Représentation schématique des voies de signalisation enclenchées par le récepteur fPR dans les neutrophiles humains .....	71
<b>Schéma 23:</b> Clivages des phospholipides par les phospholipases (Wikipedia) .....	72
<b>Schéma 24 :</b> La famille des protéine kinases B .....	75
<b>Schéma 25:</b> MAPK-pathway-mammalian (Wikipedia).....	77
<b>Schéma 26 :</b> Les isoformes des PKC (adapté à partir de Newton et al, 2010).....	80
<b>Schéma 27 :</b> La structure secondaire de mTOR (Don B. and al, Nature Reviews Drug Discovery 2011)....	84
<b>Schéma 28 :</b> La structure tertiaire de mTOR-mLST8 (Yang H. and al, Nature 2013) .....	84
<b>Schéma 29 :</b> Structure de mTORC1 et de ses composants (Sabatini et al. Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010).....	85
<b>Schéma 30 :</b> Reconstitution 3D de la dimérisation de mTORC1 (Yip CK. et al. Mol. Cell 2010) .....	86

<b>Schéma 31</b> : Structure de mTORC2 et de ses composants (Sabatini et al. Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010).....	86
<b>Schéma 32</b> : Phosphorylation séquentielle de 4E-BP1 par mTOR (Hay et Sonenberg, Genes & Development 2004).....	88
<b>Schéma 33</b> : Les substrats de mTORC1 participent à l'initiation de la traduction et son élongation (Schéma adapté à partir de Sabatini et al., Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010) .....	89
<b>Schéma 34</b> : L'initiation de la transcription des ARN ribosomiaux est contrôlée par mTORC1 (Mayer C. et Grummt I. Oncogene 2006).....	90
<b>Schéma 35</b> : Modèle proposé expliquant la régulation de phosphorylation d'ULK1 et de l'autophagie par mTORC1 (Kim et al., Nat Cell Biol 2011).....	91
<b>Schéma 36</b> : Modèle proposé pour la régulation de l'activité transcriptionnelle de SREBP par mTORC1/Lipin1 (Peterson TR et al. Cell 2011).....	91
<b>Schéma 37</b> : Fonctions directes et indirectes de mTORC2 (Oh & Jacinto, Cell cycle 2011).....	92
<b>Schéma 38</b> : mTORC2 régule la stabilité du polysome (Oh WJ and al, EMBO J 2010).....	93
<b>Schéma 39</b> : Activation de mTORC1 (Sabatini et al., Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010).....	96
<b>Schéma 40</b> : Localisation des sites phosphorylés de mTOR (Acosta-Jacquez HA, 2009).....	98
<b>Schéma 41</b> : L'activation de mTORC1 intègre des signaux sur l'environnement extracellulaire comme intracellulaire (Adapté de Sabatini et al., Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010) .....	99
<b>Schéma 42</b> : mTORC1 est au carrefour entre maladies inflammatoires et cancers (Lee DF. et al, Cell 2007) .....	104
<b>Schéma 43</b> : Les stratégies d'inhibition des fonctions cellulaires associées à mTOR (schéma adapté de Zytseva YY., et al, Cancer Lett. 2012).....	109
<b>Schéma 44</b> : Le site kinase de mTOR obstrué par Rapamycine-FKBP12 (Yang H. and al, Nature 2013) ..	110
<b>Schéma 45</b> : Les différents rapalogues (Illustration adaptée de Benjamin et al., Nature Reviews Drug discovery 2011) .....	111
<b>Schéma 46</b> : Architecture d'une sinusoiide hépatique (Adapté de Frevert et al, 2005).....	116
<b>Schéma 47</b> : Le recrutement des neutrophiles dans un contexte de sepsis (Adapté à partir de Brown KA et al, Lancet 2006).....	124

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les granules et leurs contenus (adapté à partir de Faurschou et al, 2003).....	17
<b>Tableau 2</b> : Ligands endogènes des TLR (adapté à partir de Yu et al, 2010).....	38
<b>Tableau 3</b> : Les fonctions des neutrophiles associées aux TLR (adapté à partir de Christina et al, 2013) .....	39
<b>Tableau 4</b> : Les ligands des fPRs (adapté à partir de Le et al, 2002).....	46
<b>Tableau 5</b> : Répartitions et fonctions des NOX (d'après Bedard et Krause, 2007).....	52
<b>Tableau 6</b> : Exemple de protéines G (Adapté d'après Nestler EJ et al, 1999) .....	70
<b>Tableau 7</b> : Composition des complexes mTORC1 et mTORC2 (Sabatini et Laplante Cell 2012).83	
<b>Tableau 8</b> : Les inhibiteurs de mTOR de seconde génération (Adapté à partir de Lisi L et al, Biomed Res Int 2015) .....	112
<b>Tableau 9</b> : Les inhibiteurs PI3K/mTOR (Adapté à partir de Lisi L et al, Biomed Res Int 2015) .	113
<b>Tableau 10</b> : Evolution de la cirrhose hépatique (d'après d'Amigo G et al, 2006) .....	118

# Abréviations

4EBP1	eiF4E-binding protein
Aa	Acide aminé
AAT	$\alpha$ 1-antitrypsine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIR	auto-inhibitory region
AKT / PKB	Protéine kinase B
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Acide phosphatidique
ARN	Acide ribonucléique
ASK	Apoptosis signal-regulation kinase
ATG13	Autophagy-related protein 13
ATP	Adénosine triphosphate
BPI	Bactericidal permeability incresing protein
C3	Composant du complément 3
C5a	Complement component 5a, composant 5a du complément
CCL	(comme le CCL3)
CD	Cluster of differentiation
CGD	Chronic granulomatous disease
CR	Récepteur du complément
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	Récepteur de chimiokine au motif CXC
Cyto B	Cytochalasine B
DAG	1,2-diacylglycérol
DEP	<b>d</b> isheveled, <b>e</b> gl-10, <b>p</b> leckstrin
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DUOX	dual oxidase
E.coli	Escherichia Coli
eiF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FAT	Focal adhesion targeting
FATC	Domaine FAT en C-terminal
FC	Fragment crystallisable
FIP2000	Fusion inhibitory peptide 2000
FKBP	FK506 binding protein
fMLP	formyl-Methionyl-leucyl-Phenylalanine
fPR	formyl peptide receptor, récepteur du fMLP
FRAP	FKBP-12-Rapamycin associated protein
FRB	FKBP-12-Rapamycin domain
FRO	Formes réactives de l'oxygène
GAP	GTPase activating protein
G-CSF	Granulocyte - Colony stimulating factor

GDP	Guanosine diphosphate
GEF	GTP exchange factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor
GTP	Guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
Heat	<b>H</b> untingtin, elongation, factor 3, protein PP2 <b>A</b> , and yeast kinase <b>T</b> OR1
HIF	Hypoxia-inducible factor
HL60	Human promyelocytic leukemia cells
HOCI	Acide hypochlorique
IC50	Concentration inhibitrice médiane
ICAM	intercellular adhesion molecule
IKK	Iκβ kinase
IL	Interleukine
LC3	light chain 3
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin-Rich-Repeats
LTB4	leukotriene B4 receptor 1
MAM	<b>M</b> itochondria- <b>A</b> ssociated <b>E</b> R <b>M</b> embrane
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MEK	Mitogen extracellular kinase
MIP	Macrophage inflammatory protein
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
MPO	Myéloperoxidase
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC	mammalian target of rapamycin complex
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEI	Neutrophil elastase inhibitor
NOX	NADPH oxidase
O <sub>2</sub> <sup>-°</sup>	Anion superoxyde
OH <sup>°</sup>	Radical hydroxyle
PAF	platelet-activating factor
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PB1	Phox and Bem1p domain
PDGF	platelet-derived growth factor
PDZ	<b>p</b> ostsynaptic density 95, <b>d</b> iscs large, <b>z</b> onula occludens-1
PH	pleckstrin homology
Phox	Phagocyte oxidase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3 phosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C

PLD	Phospholipase D
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
PN	Polynucléaire neutrophile
PP2A	Protein phosphatase 2 A
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRAS40	Proline-rich Akt-substrate 40
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PRR	Proline rich region
PRR5L	Proline rich 5 like
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PX	Phox homology domain
Rac	ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAPTOR	regulatory associated protein of mTOR
RBD	Ras-binding domain
RCPG	Recepteurs couplés aux protéines G
RGS	Regulatory G protein signaling
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rho-GDI	Rho GDP-dissociation inhibitor
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RTK	récepteur à activité tyrosine kinase
S6K1	S6 kinase polypeptide 1
Ser	Sérine
SH3	Src Homology domain
SIN1	Stress-Activated Map Kinase-Interacting Protein 1
SOD	Superoxyde dismutase
SREBPS	Sterol regulatory element-binding proteins
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Thr	Thréonine
TIR	Toll/IL-1R/R
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TOR	Target of Rapamycin
TOS	TOR signaling
TSC	Tuberous sclerosis
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1



# I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les neutrophiles jouent un rôle majeur dans l'élimination des agents pathogènes. Cette fonction de défense innée nécessite une coordination fine de deux activités majeures ; la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) via la génération d'anion superoxyde par la NADPH oxydase 2 (NOX2 / gp91<sup>phox</sup>), un phénomène appelé explosion oxydative, et la libération du contenu enzymatique stocké dans les granules intracellulaires du neutrophile (dégranulation). Une élimination efficace des bactéries nécessite une expression et activation optimale de la NADPH oxydase et des enzymes granulaires. En effet, dans certaines pathologies d'origine génétique (Granulomatose septique) ou induites (cirrhoses), des défaillances fonctionnelles des neutrophiles sont récurrentes et augmentent la susceptibilité des patients aux infections bactériennes pouvant être mortelles. L'explosion oxydative des neutrophiles est induite par un grand nombre d'agents particuliers ou solubles qui activent des récepteurs membranaires, notamment les peptides bactériens N-formylés qui activent le fPR, un récepteur couplé aux protéines G qui est largement étudié dans les laboratoires à l'aide du peptide f-Met-Leu-Phe (fMLP). L'activation du fPR déclenche une cascade d'événements biochimiques impliquant de nombreux effecteurs internes (transduction du signal), notamment la protéine kinase B (AKT), la phospholipase D (PLD), les protéine kinases C (PKC) ou encore les MAP-kinases, qui contribuent à activer la NADPH oxydase.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à la signalisation intracellulaire du fPR qui mène à l'activation de la NADPH oxydase des neutrophiles d'individus sains, et provenant de patients ayant une cirrhose alcoolique sévère. Mes objectifs expérimentaux s'articulaient autour de deux projets complémentaires dont la finalité vise à identifier les bases moléculaires sensibles aux atteintes pathologiques, en vue de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter les infections bactériennes. Mes recherches ont généré des données originales qui apportent un nouvel éclairage sur la régulation moléculaire de l'explosion oxydative du neutrophile et ses défaillances chez les patients atteints de cirrhose hépatique alcoolique décompensée.

Mon premier projet a consisté à explorer la contribution d'une protéine kinase ubiquitaire, mTOR, qui restait ignorée jusqu'ici dans l'explosion oxydative de neutrophiles. Elle est connue pour réguler de nombreuses réponses cellulaires de base. Elle est activée via AKT et PLD, qui sont deux effecteurs importants de l'explosion oxydative des neutrophiles. J'ai pu montrer que mTOR est un nouvel effecteur majeur de l'explosion oxydative agissant en amont de la voie MAP-kinase/p47<sup>phox</sup>/NOX2. Dans les neutrophiles de patients ayant une cirrhose alcoolique sévère, cette voie est fortement défaillante et l'inhibition de mTOR par le médicament immunosuppresseur

rapamycine aggrave le déficit d'explosion oxydative. Ce premier projet a fait l'objet d'une publication en 2013 (Rolas et Coll, Hepatology) et sera présenté sous forme d'article (Article 1).

Dans le deuxième projet, j'ai montré que le déficit de l'explosion oxydative des neutrophiles de patients cirrhotiques provient également d'un défaut d'expression des composants de la NADPH oxydase, notamment de la NOX2 (gp91phox). Ce déficit est lié à une dégradation intense de la gp91<sup>phox</sup> par l'élastase libérée au cours de la dégranulation des neutrophiles ou présente dans le plasma des patients cirrhotiques. De plus, j'ai pu corriger ce déficit à l'aide d'un agoniste de TLR7/8, ce qui ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ce projet, non encore publié, sera présenté également sous forme de manuscrit en anglais (Manuscrit 2).

J'ai également contribué au projet de thèse en cours de M. Boussif Abdelali sur les mécanismes de défaillance transductionnelle de la dégranulation des neutrophiles des patients cirrhotiques. Ce travail en cours de révision favorable dans le « Journal of Hepatology », est présenté sous forme de manuscrit soumis (Manuscrit 3).

Pour terminer, j'ai eu l'opportunité d'étudier les défaillances d'activité de la NADPH oxydase une approche virale dans des monocytes humains et HEK293 infectées par le virus O'nyong-nyong qui est proche du virus du Chikungunia. Ceci m'a permis d'identifier des atteintes transductionnelles sévères similaires à celle de la cirrhose hépatique (AKT, MAP-Kinases) dans les cellules stimulées via le fPR. Ce travail fait l'objet d'un manuscrit qui a été évalué par le Journal « PLoS Pathogens » et qui propose de le renforcer pour une re-soumission (Manuscrit 4).

Avant d'exposer mes travaux expérimentaux, je ferai un rappel sur les données bibliographiques centrées sur les principales fonctions de défense du neutrophile, les récepteurs de défense du neutrophile, la NADPH oxydase, les voies de signalisation mobilisées par le fPR, la protéine kinase mTOR et l'implication des neutrophiles dans les maladies inflammatoires telle que la cirrhose hépatique. Je rapporterai ensuite les travaux de mes recherches dans une deuxième partie qui sera suivie d'une discussion générale de mes résultats avec les données de la littérature, et de mes perspectives de recherches.

## **II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **1 - Le polynucléaire neutrophile : Origine, devenir et fonctions principales**

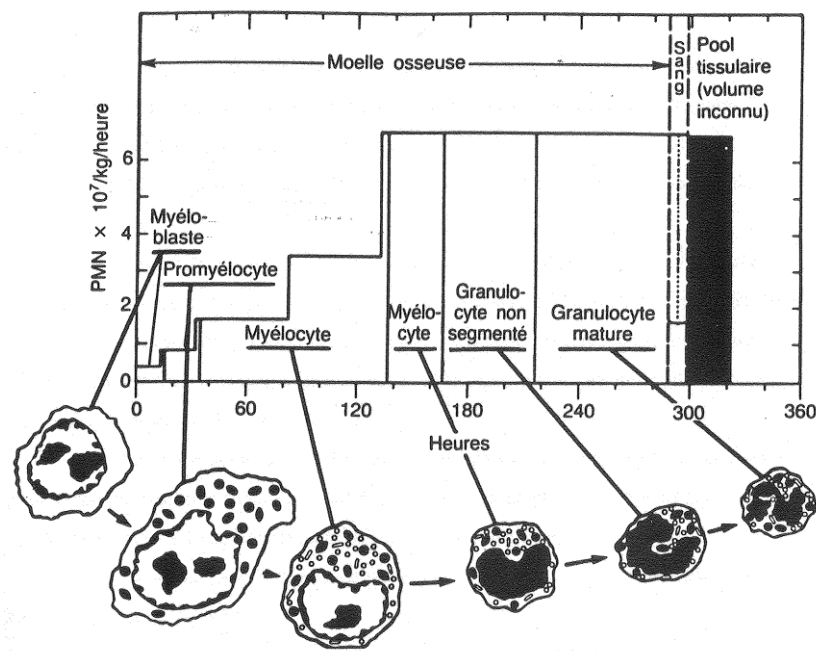
Les polynucléaires neutrophiles abrégés dans cette thèse en PN ou neutrophile constituent la plus grande famille de leucocytes circulant, jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les microorganismes et participent également aux phénomènes inflammatoires non infectieux. Le fonctionnement des PN peut être schématiquement divisé en quatre grandes étapes : le déplacement des PN vers ses cibles (microorganismes par exemple), l'adhérence à la cible, la phagocytose, et la destruction des microorganismes par différents mécanismes, notamment dépendants de l'oxygène s'intégrant dans le cadre du phénomène appelé explosion oxydative.

## **1.1 Origine et devenir du neutrophile**

Les neutrophiles dérivent comme toutes les cellules sanguines d'une même cellule souche le précurseur hématopoïétique pluripotent nommé HPP-CFC (High proliférative Potential-Colony Forming Cell) qui représente moins de 0,1% des cellules. Cette cellule souche donne naissance à une cellule souche myéloïde puis aux progéniteurs des granulocytes et des monocytes-macrophages (GM-CFC), étape suivie de la formation du progéniteur direct des polynucléaires (G-CFC). Chaque étape est régulée et orientée par l'intervention de différentes cytokines (IL-3, GM-CSF, G-CSF, IL1 et IL6). La cellule G-CFC se transforme en myéloblaste puis en promyélocyte et en myélocyte ; cette phase dite mitotique dure environ 7 jours et est caractérisée par l'apparition successive des granulations azurophiles (ou primaires) puis des granulations spécifiques (ou secondaires) qui définissent le type du polynucléaire. Elle est suivie par une phase non répliquative, dite post-mitotique qui dure environ 6 jours ; au cours de cette phase, le myélocyte se transforme en métamyélocyte puis en polynucléaire mûre, caractérisé par un noyau polylobé. Les polynucléaires mûres restent de 0 à 5 jours dans la moelle osseuse où ils constituent le secteur de réserve médullaire. La moelle produit environ  $0,85 \text{ à } 1,6 \times 10^9$  neutrophiles par kg et par jour dans les circonstances normales. Cette production peut augmenter si des circonstances pathologiques l'exigent, en particulier au cours d'un état infectieux (Manz MG et al, 2014). Le neutrophile quitte la moelle osseuse pour passer dans la circulation sanguine. Le G-CSF joue un rôle central dans cette libération des neutrophiles. Il agit notamment en diminuant l'expression du CXCL12 ( $\text{SDF1}\alpha$ ), ligand du CXCR4, un récepteur chimiotactique

impliqué dans la rétention des neutrophiles dans la moelle osseuse. Le G-CSF augmente également l'expression de Gro $\beta$ , ligand du CXCR2 par les cellules stromales de la moelle osseuse (Eash KJ et al, 2010). L'activation de CXCR2 désensibilise les voies de signalisation du CXCR4 favorisant ainsi la libération des neutrophiles (Eash KJ et al, 2009 ; Lapidot T et al, 2002).

Le neutrophile reste un temps limité dans le sang circulant ( $T_{1/2}$  = 6 heures), l'ensemble de ses fonctions physiologiques s'exerçant principalement dans les tissus. Les neutrophiles sanguins se répartissent en deux secteurs à peu près équivalents : un secteur circulant, accessible à la numération sanguine (1800 à 7000 PN/ml de sang), et un secteur marginé (environ 50% du pool total), adhérant à l'endothélium au niveau des veinules post-capillaires. Sous l'influence de différents stimuli, les neutrophiles à l'état de repos dans le sang circulant, adhèrent à la paroi vasculaire, se glissent entre les cellules endothéliales (diapédèse) et migrent vers les tissus. La survie tissulaire, difficile à mesurer de façon précise, était estimée à environ 1 à 2 jours. Cependant, avec les techniques de marquage fluorescent des PN, il a été montré que ceux-ci vont dans les ganglions avec une durée de vie pouvant atteindre 5-6 jours (Chtanova T et al, 2008) Les neutrophiles entrent ensuite en apoptose et sont phagocytés et détruits par les macrophages.



**Schéma 1:** Les différentes étapes de maturation du neutrophile (d'après Bainton, 1986)

## 1.2 Contenu des granules du neutrophile

Granules azurophiles	Granules spécifiques	Granules gélatinases	Vésicules sécrétoires
<b>Membrane</b>			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Alcaline phosphatase
CD68	CD15	Cytochrome <i>b<sub>558</sub></i>	CD10
Presenilin 1	CD66	Diacylglycerol deacetylase	CD11b/CD18
Stomatine	CD67	fMLP-R	CD13
H <sup>+</sup> -ATPase de type V	Cytochrome <i>b<sub>558</sub></i>	Leukolysine	CD14
Vitronectine-R	fMLP-R	NRAMP-1	CD16
	Fibronectine-R	SCAMP	CD45
	Sous-unité $\alpha$ de la protéine G	SNAP-23, -25	CR1
	Laminine-R	uPA-R	C1q-R
	Leukolysine	VAMP-2	Cytochrome <i>b<sub>558</sub></i>
	Antigène NB1	H <sup>+</sup> -ATPase de type V	DAF
	Protéine de 19 kDa		fMLP-R
	Protéine de 155 kDa		Leukolysin
	Rap1, Rap2		VAMP-2
	SCAMP		V-type H <sup>+</sup> -ATPase
	SNAP-23, -25		
	Stomatine		
	Thrombospondine-R		
	TNF-R		
	uPA-R		
	VAMP-2		
<b>Matrice</b>			
Acide $\beta$ -glycerophosphatase	$\beta_2$ -Microglobuline	Acetyltransferase	Protéines plasmatiques
Acide mucopolysaccharide	Collagenase	$\beta_2$ -Microglobulin	
$\alpha_1$ -Antitrypsine	CRISP-3 (SGP-28)	CRISP-3	
$\alpha$ -Mannosidase	Gélatinase	Gélatinase	
Azurocidine	hCAP-18	Lysozyme	
BPI	Histaminase		
$\beta$ -Glycerophosphatase	Heparanase		
$\beta$ -Glucuronidase	Lactoferrin		
Cathepsines	Lysozyme		
Defensines	NGAL		
Elastase	uPA		
Lysozyme	Sialidase		
MPO	Transcobalamine-I		
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase			
Protéinase-3			
Sialidase			
Ubiquitine			

**Tableau 1 : Les granules et leurs contenus (adapté à partir de Faurschou et al, 2003)**

Le contenu des granulations des neutrophiles joue un rôle important dans leurs fonctions. Il existe quatre types de granulations connues dans les neutrophiles : les granules primaires ou azurophiles, les granules secondaires ou spécifiques, les granules tertiaires ou gélatinases (ou « replenishosomes ») et les vésicules sécrétoires. La répartition des différents composants contenus dans les différents types de granulations est indiquée dans le Tableau 1 :

- Les granulations primaires ou azurophiles doivent leur dénomination au fait qu'elles apparaissent les premières au cours de la maturation du neutrophile dans la moelle et qu'elles ont une affinité pour les composants azures. Ces granulations, constituent le tiers des granulations du PN (environ 1500 granulation/neutrophile), sont des organites de petite taille (0,5-0,8  $\mu$ m), de forme allongée qui apparaissent très denses en microscopie électronique. Les granules azurophiles peuvent être subdivisées en deux sous-catégories selon leur teneur en défensines : Les granules azurophiles précoces pauvres en défensines et qui apparaissent au début du stade promyélocytaire, et les granules

azurophiles tardives riches en défensines et qui se forment durant la transition promyélocyte/myélocyte (Arnljots K et al, 1998)

- Les granulations secondaires ou spécifiques (peroxydase négatives) sont des organites sphériques de taille inférieure à celle des granulations azurophiles (environ 0,2  $\mu$ m) ou en forme de bâtonnets (0,1 x 1  $\mu$ m), apparaissent claires en microscopie électronique. La granule contient des protéines antimicrobiennes comme le lysozyme, la lipocaline NGAL, hCAP-18 ou la lactoferrine. Elle contient également de nombreuses protéines membranaires telles que le cytochrome  $b_{558}$  essentiel à l'activité de la NADPH oxydase ou encore des récepteurs pour les chimioattractants comme le récepteur au peptide bactérien formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF ou fMLP) appelé fPR qui sera détaillé dans les chapitres ultérieurs.

- Les granulations tertiaires, de petites tailles, sont moins bien caractérisées et plus hétérogènes que les deux précédentes. Ces granules jouent un rôle essentiel dans la diapédèse des neutrophiles puisqu'elles sont riches en protéines dégradant la matrice interstitielle. A ce titre la collagénase a la capacité de dégrader les composants essentiels de cette matrice à savoir les collagènes de type IV et V (Borregaard N et Cowland JB, 1997). Enfin, tout comme les granules spécifiques, les granules gélatinases contiennent de grandes quantités de protéines membranaires comme le fPR ou le cytochrome  $b_{558}$ .

- Les vésicules sécrétoires sont des vésicules endocytiques constituant un large réservoir de récepteurs membranaires nécessaires pour le passage du neutrophile d'un état passif à une cellule effectrice de l'immunité innée. Ces protéines sont les dernières granules à être formées mais les premières à être dégranulées. En effet, l'incubation des cellules à 37°C suffit pour provoquer l'exocytose de ces vésicules (Sengelov H et al, 1994). Ces vésicules contiennent donc une large variété de récepteurs aux molécules chimioattractantes tels que le fPR (récepteur de peptides bactériens) ou encore des récepteurs des molécules du complément.

Sous l'effet de différents stimuli, survient une mobilisation instantanée des granulations avec déversement de leur contenu dans le milieu extracellulaire, dans les phagosomes (dégranulation ou exocytose). Cette réponse enrichit également la membrane plasmique avec des récepteurs initialement stockés dans la membrane des granules. Certains composants granulaires (élastase, myéloperoxydase) se fixent à la surface cellulaire. Cette dégranulation permet ainsi une décompartimentalisation rapide des molécules stockées dans les granulations des neutrophiles et leur permet alors d'intervenir dans différents sites de la cellule, jouant un rôle majeur dans les fonctions des neutrophiles.

## 1.3 Principales étapes de l'activité anti-infectieuse rapide du neutrophile

Les neutrophiles constituent une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes. Le neutrophile joue notamment un rôle critique dans la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et fongiques et est également protecteur dans certaines infections virales via les défensines. Le neutrophile exerce aussi une activité antiparasitaire et en particulier antiplasmodiale. Les étapes conduisant à la destruction d'un microorganisme par le neutrophile sont très souvent imbriquées, mais pour plus de clarté elles seront traitées successivement. Ces étapes font intervenir l'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale et au substratum extracellulaire, le déplacement vers le site infectieux, le contact avec les microorganismes suivi (ou non) de phagocytose et de bactéricidie par des mécanismes dépendants ou indépendants de l'oxygène.

### 1.3.1 Adhérence

Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles sont au repos dans le sang circulant. En réponse à une invasion microbienne, les neutrophiles adhèrent à l'endothélium vasculaire, s'infiltrant entre les cellules endothéliales (diapédèse) et migrent vers le site inflammatoire. L'adhérence à l'endothélium vasculaire constitue la première étape de migration des neutrophiles vers les tissus. Cela implique une cascade d'événements complexes et régulées de façon précise. Ces interactions entre polynucléaires et cellules endothéliales sont médiées par des récepteurs de surface exprimés sur les deux types cellulaires

#### a) Récepteurs cellulaires impliqués dans l'interaction entre neutrophiles et cellules endothéliales

Les récepteurs cellulaires appartiennent à différentes grandes familles de protéines jouant un rôle dans l'adhésion intercellulaires. L'adhésion entre neutrophile et cellule endothéliale fait intervenir essentiellement les sélectines et les  $\beta 2$  intégrines.

La famille des sélectines est constituée de trois types de glycoprotéines de membrane qui contrôlent les interactions neutrophile-cellule endothéliale par liaison à des ligands hydrates de carbone : la L-sélectine (LAM-1 ou CD62L) à la surface des neutrophiles ; la P-Sélectine (GMP-140 ou CD62) découverte initialement dans les plaquettes mais présente également dans les cellules endothéliales et la E-Sélectine (ELAM-1 ou CD62E) des cellules endothéliales. Les sélectines se lient à des structures carbohydrates et en particulier à des oligosaccharides dont le Lewis x (CD15), le sialyl-Lewis x (sLE<sup>X</sup>) et le sialyl-Lewis a (sLE<sup>a</sup>). Des glycoprotéines exprimant l'antigène Lewis x et son dérivé sialylé sont présentes à la surface des polynucléaires neutrophiles et dans les granulations intracellulaires spécifiques et azurophiles. La L-sélectine présente à la surface des



neutrophiles au repos joue un rôle majeur dans les phénomènes de roulement du neutrophile à la surface de l'endothélium en adhérant à différentes molécules et notamment aux E et P-sélectines induites à la surface des cellules endothéliales par différents stimuli provenant du foyer inflammatoire.

L'étude des déficits en protéine d'adhésion a clairement déterminé l'importance des récepteurs  $\beta 2$ -intégrines dans la migration des neutrophiles vers les sites infectieux. Les  $\beta 2$ -intégrines sont des hétérodimères associés de façon non covalente comprenant une sous-unité  $\alpha$  particulière à chaque molécule et une sous-unité  $\beta$  commune aux trois molécules ( $\beta 2$  : CD18). Les sous-unités  $\alpha$  sont  $\alpha L$  (CD11a),  $\alpha M$  (CD11b) et  $\alpha x$  (CD11c) respectivement pour LFA-1, MO-1 (ou Mac-1 ou CR3) et p150/95. Les molécules CD11b et CD11c sont stockées dans les granulations des neutrophiles, mais aucun site de stockage n'a été identifié pour CD11a. L'expression de CD11b et CD11c à la surface du neutrophile augmente à la suite d'une stimulation par différents facteurs incluant les ionophores calciques, les esters de phorbol, les peptides formylés, le GM-CSF, le  $TNF\alpha$ , l'IL-8, le PDGF ou le LTB<sub>4</sub>. Cette augmentation d'expression du CD11b et CD11c est liée à une translocation du stock intragranulaire à la surface membranaire. Deux ligands pour les hétérodimères CD11/CD18 ont été identifiés au niveau de la cellule endothéliale. Il s'agit des molécules d'adhésion intercellulaire 1 et 2 (ICAM-1 et ICAM-2). L'expression en surface d'ICAM-1 est très faible et est augmentée par les cytokines, alors que l'expression d'ICAM-2 est constitutive et n'est pas augmentée par l'activation de l'endothélium. ICAM-1 et ICAM-2 interagissent avec LFA-1. La molécule ICAM-1 est également reconnue par Mac-1. D'autres structures présentes à la surface de la cellule endothéliale interagissent avec Mac-1 et p150/95. Une interaction entre la E-Sélectine et les molécules CD11b/CD18 et CD11a/CD18 a notamment été rapportée.

#### b) Physiologie de l'adhérence du PN à la cellule endothéliale

L'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale implique une série d'événements régulés de façon très précise. Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles sont au repos dans le sang circulant. Au cours d'un état inflammatoire, débute une première phase de préactivation des cellules endothéliales par des stimulants tels que l'histamine, la thrombine, le  $TNF\alpha$ , l'IL-1 et l'endotoxine. Ceux-ci augmentent l'expression des E et P-sélectines à la surface de la cellule endothéliale. Au cours de cette phase, l'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale fait intervenir la L-sélectine. L'adhésion est alors de faible affinité conduisant, de ce fait, à des phases consécutives d'attachement puis de détachement du neutrophile à la cellule endothéliale. Ce phénomène aboutit au roulement ou « rolling » du neutrophile le long de l'endothélium. Secondairement, l'histamine et la thrombine induisent la synthèse par les cellules endothéliales de PAF membranaire. Par ailleurs, le  $TNF\alpha$ , l'IL-1 et l'endotoxine induisent la sécrétion d'IL-8 endothéliale. Le PAF et l'IL-8 activent le neutrophile

entraînant la disparition rapide de la L-sélectine de la surface cellulaire par coupure protéolytique. Débute alors une phase dépendante des  $\beta 2$ -intégrines et notamment de la molécule CD11b/CD18. En effet, simultanément, l'activation des neutrophiles par différents médiateurs tels que des chimioattractants (C5a, LTB<sub>4</sub>, fMLP), des cytokines (IL-8, GM-CSF, TNF $\alpha$ ), le PAF et la E-sélectine entraîne, d'une part, une augmentation rapide et transitoire de l'affinité des  $\beta 2$ -intégrines constitutivement exprimées à la surface du neutrophiles, et d'autre part la translocation des molécules CD11b/CD18 et CD11c/CD18 des sites intracellulaires vers la membrane cellulaire. L'adhésion médiée par les  $\beta 2$ -intégrines est de forte affinité. Le neutrophile sera ensuite amené à ramper sur le long de la paroi vasculaire en utilisant ses intégrines (CD11a/CD18, CD11b/CD18) à la recherche de jonctions intercellulaire les plus proches (Phillipson M et al, 2006). Enfin, au cours de la dernière étape, le neutrophile change de forme et se glisse entre les cellules endothéliales. La diapédèse des neutrophiles, c'est-à-dire le franchissement des jonctions intercellulaires de la paroi endothéliale fait alors intervenir les molécules d'adhésion PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell adhesion molecule 1) et les JAMs (junctional adhesion molecule) qui interagissent avec leurs homologues à la surface des neutrophiles (Borregaard N, 2010). Après avoir franchi la paroi endothéliale le neutrophile se fraye un chemin au travers de la membrane basale en libérant ses granules contenant des protéases capable de dégrader les collagènes et les lamines (Faurschou M et Borregaard N, 2003).

### 1.3.2 Déplacement du neutrophile

Le neutrophile est l'une des cellules les plus mobiles que l'on connaisse, mis à part les spermatozoïdes. En l'absence d'attractants, le neutrophile se déplace au hasard. Sous l'influence d'un gradient de substances chimioattractantes, les neutrophiles marginés peuvent traverser l'endothélium (diapédèse) et migrer dans les tissus vers la cible ; la cible pouvant elle-même être à l'origine de cette activité chimioattractante. Le déplacement orienté est désigné sous le nom de chimiotactisme positif dans le cas où les neutrophiles se déplacent vers la source et négatif s'ils se déplacent en sens inverse. On désigne par chimiocinèse la vitesse de déplacement des cellules. Cette réponse cellulaire est généralement stimulée par de faibles concentrations de chimioattractants mais inhibée par de fortes concentrations (Périanin et Coll, 1982).

#### a) Les facteurs cellulaires du déplacement

Pour se déplacer, le neutrophile doit d'abord adhérer à un support : *in vivo*, il s'agit de l'endothélium vasculaire, des fibres de collagène et d'autres substances matricielles tissulaires. Les déficits en protéine d'adhésion de type  $\beta 2$ -intégrine s'accompagnent d'un déficit de la locomotion des neutrophiles. Ces déficits illustrent la nécessité de l'expression normale des protéines d'adhésion à la surface des neutrophiles pour leur déplacement

#### b) Les facteurs inducteurs du déplacement

Les chimioattractants sont des facteurs directement actifs sur la cellule, c'est-à-dire ne nécessitant pas de transformation préalable ; ils sont à différencier des chimiotaxinogènes qui n'agissent pas directement sur la cellule, mais induisent la formation de chimioattractants par auto transformation ou par action sur une autre molécule. Les chimioattractants et les chimiotaxinogènes sont de nature endogène ou exogène. La plupart des chimioattractants physiologiques sont à la fois chimiotactiques et chimiocinétiques positifs, ce qui induit un déplacement orienté et accéléré vers la cible. Il faut souligner un effet d'amplification lié à la migration des neutrophiles sur le site inflammatoire, les neutrophiles stimulés produisent eux-mêmes des chimioattractants (par exemple, Paf, LTB<sub>4</sub>, IL-8).

#### c) Physiologie du déplacement

En présence d'un chimioattractant, le neutrophile subit des modifications de forme et se polarise. La cellule émet alors de larges expansions cytoplasmiques ou lamellipodes à l'avant, et une protubérance postérieure ou uropode : ainsi, le neutrophile acquiert une polarité cellulaire de type tête-queue accompagnée d'une redistribution des différentes structures cytoplasmiques. Le neutrophile migre vers une concentration croissante de chimioattractant (gradient). Le neutrophile franchit le réseau de fibres qui constitue la matrice extracellulaire en utilisant les portions élastiques de ces fibres mais sans dégradation protéolytique (Witko-Sarsat V et al, 2000).

Les récepteurs chimiotactiques activés sur le neutrophile polarisé se trouvent de manière prédominante au niveau de la partie antérieure (front). Les récepteurs du C5a, du PAF, du LTB<sub>4</sub> et des chimiokines sont des récepteurs à 7 segments transmembranaires de la famille des  $\beta$ -adrénergiques. Ils sont liés à une protéine G qui est un des premiers éléments de transduction du signal (que nous détaillerons plus loin) vers le système moteur du neutrophile. Ce système moteur du neutrophile est constitué d'actine dont le degré de polymérisation conditionne la fluidité cellulaire. L'actine est l'une des protéines les plus abondantes des neutrophiles (5-10% des protéines totales). Elle se trouve sous forme globulaire (actine G) dans la cellule au repos ; au cours d'une stimulation, elle s'assemble en long filaments (actine F). Cet assemblage s'effectue en deux étapes : la nucléation (liaison de 3 à 4 monomères) puis l'élongation en filaments. L'un des extrémités du filament s'accroît alors que l'autre subit un raccourcissement. D'autres protéines sont impliquées dans la croissance ou la rupture du filament : la profiline, l'acumentine et la gelsoline. Au niveau des lamellipodes, d'autres protéines sont présentes comme la protéine liant l'actine et la myosine qui joue un rôle important dans la contractilité cellulaire. Les éléments moteurs du déplacement (actine F, myosine, protéine liant l'actine) sont localisés de façon prédominante au niveau frontal de la cellule, tandis que la pinocytose a essentiellement lieu au niveau de l'uropode. Durant la migration, les neutrophiles adhèrent au

support par de minuscules protubérances ou points d'ancrage situés de préférence au niveau de la région frontale, mais aussi du corps cellulaire et parfois de l'uropode.

### 1.3.3 Phagocytose

Arrivé au contact de sa cible, le neutrophile va essayer de l'englober lorsqu'il s'agit d'une cible particulière de petite taille. Ce processus d'englobement comporte lui-même différentes étapes, tout d'abord de reconnaissance et d'adhérence puis d'englobement proprement dit.

#### a) La reconnaissance et l'adhérence à la cible

Cette étape est sous la dépendance de nombreux facteurs extracellulaires et cellulaires. L'adhérence dépend notamment des rapports entre les charges électriques des surfaces en présence. Cette adhérence est plus ou moins facilitée par des récepteurs présents à la surface des neutrophiles (« Pattern Recognition Receptors » ou PRR) reconnaissant différentes structures présentes sur la cible ou formant un lien entre la cible et neutrophile (« Pathogen Associated Molecular Patterns » ou PAMP). Des interactions directes interviennent entre cibles et neutrophiles par l'intermédiaire d'autres récepteurs, par exemple pour des structures sucrés (fucose, mannose,  $\beta$ -glucane) ou des protéines de la paroi du microorganisme.

Des facteurs extracellulaires permettent de faciliter l'adhérence entre la cible et le neutrophile. Ils sont constitués essentiellement par les opsonines dont il existe deux grandes catégories :

- Les immunoglobulines : ce sont les opsonines thermostables et spécifiques. Les classes IgG1 et IgG3 semblent préférentiellement se fixer au neutrophile. Les immunoglobulines se fixent de façon spécifique sur des antigènes de surface des microorganismes par leur site anticorps Fab. La portion Fc de l'immunoglobuline est reconnue par les récepteurs Fc du neutrophile. Au repos le neutrophile exprime les récepteurs Fc de type II (CD32) et III (CD16) qui lient les IgG1 et 3 sous forme dimérique. Le FcRI de forte affinité pour les IgG monomériques n'apparaît à la surface du neutrophile qu'après activation par l'interféron  $\gamma$ .

- Les protéines du complément dérivées du C3 : elles proviennent de l'activation du complément, soit par la voie classique médiée par la liaison initiale d'anticorps IgG ou IgM sur la cible, soit par la voie alterne activée en particulier par les surfaces des microorganismes ou par les endotoxines des bactéries gram négatif. Cette activation génère des fractions C3b, C3bi, C3bg et C3d. Le C3b et C3bi déposées à la surface de la cible se lient aux récepteurs CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18).

D'autres molécules peuvent également établir des liens entre le neutrophile et la cible microbienne, notamment certains facteurs sériques ( $\alpha$ 1, globuline, C-Réactive Protéine,  $\alpha$ 2

glycoprotéine et fibronectine) et la tuftusine, un tétrapeptide d'origine splénique. Les récepteurs permettent l'adhésion à la cible et certains doivent être activés sous l'influence de certaines cytokines ou de fibronectines extracellulaires pour déclencher la phagocytose. Cette étape peut dépendre d'une phosphorylation du récepteur. Il existe de plus une coopération entre les récepteurs Fc et les récepteurs du complément.

#### b) L'englobement

Des pseudopodes cellulaires englobent la particule, puis les extrémités des pseudopodes se rejoignent et la fusion membranaire enferme la particule dans une vacuole. Ce modèle suppose que la particule soit complètement recouverte par les opsonines. Si les particules possèdent des ligands sur une partie de leur surface seulement, ou bien en cas de particules trop volumineuses, la phagocytose complète n'est pas effectuée (phagocytose frustrée). Le neutrophile va déverser ses substances lytiques directement à la surface de la cible. La formation d'un phagosome de phagocytose n'est pas instantanée puisque les canaux le reliant à l'extérieur sont observables en microscopie électronique et qu'une dégranulation à l'intérieur et à l'extérieur continue pendant un certain temps après la formation du phagosome. Les éléments cellulaires qui participent à la phagocytose sont en partie les mêmes que ceux participant au chimiotactisme (actine, myosine, protéine liant l'actine).

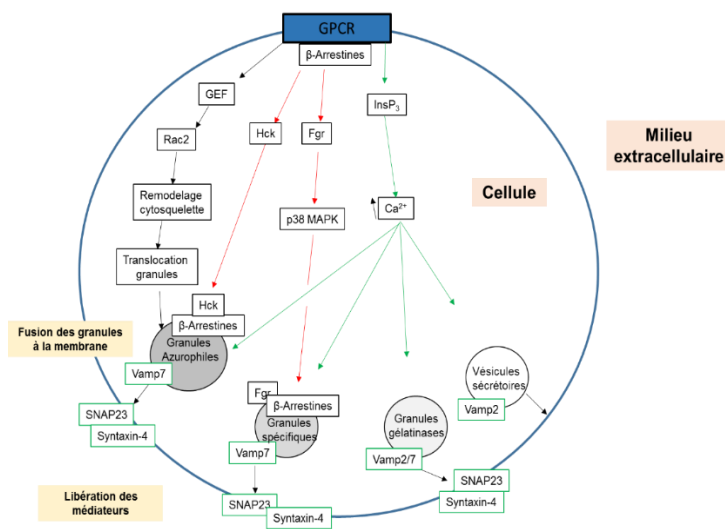
### **1.3.4 Bactéricidie**

Le neutrophile met en jeu plusieurs activités de défense pour détruire les microorganismes. La première est liée à l'action d'un ensemble de peptides et de protéines bactéricides qui sont libérées au cours de la stimulation des neutrophiles (dégranulation) et qui est indépendant de l'oxygène. Le deuxième repose sur l'utilisation de l'oxygène du milieu sous l'action d'un système enzymatique, la NADPH oxydase. Une troisième fait la synthèse des deux premiers ; elle repose sur la libération d'acides nucléiques nucléaire (les NET) accompagnés des protéases granulaires de manière dépendante de l'activation de la NADPH oxydase (Brinkmann V et al, 2004 ; Nauseef WM, 2007; Kantari C et al, 2008). Enfin, d'autres mécanismes moins étudiés dans les neutrophiles et discutés chez l'homme, utilise l'azote (NO synthase).

#### a) Le système bactéricide non dépendant de l'oxygène

Le neutrophile contient en abondance des enzymes hydrolytiques et des polypeptides antibactériens qui sont contenus dans les granules. Les vésicules sécrétoires présentent la plus grande susceptibilité à l'exocytose suivi des granules tertiaires, des granules spécifiques tandis que les granules azurophiles sont celles qui présentent la plus faible susceptibilité à être dégranulées (Faurschou M et Borregaard N, 2003). Ainsi une incubation à 37°C de neutrophiles isolés peut provoquer l'exocytose des vésicules sécrétoires (Sengelov H et al, 1994).

Le calcium revêt une importance variable dans l'exocytose des granules, seules de faibles concentrations sont nécessaires pour l'exocytose des vésicules sécrétoires et granules gélatinases tandis que des concentrations plus élevées sont nécessaires pour provoquer l'exocytose des granules spécifiques et azurophiles. Ces différences sont causées par les différentes molécules de signalisation impliquées dans l'exocytose de chaque granule : Ainsi, le calcium est impliqué dans l'interaction des v-SNARE (VAMP) de la surface de la granule avec le t-SNARE (Syntaxin, SNAP) de la membrane plasmique. Cependant, la libération des granules spécifiques et azurophiles dépend également des tyrosines kinases et p38-MAPK, ainsi que de Rac2 pour les granules azurophiles (Lacy P, 2006), ce qui expliquerait pourquoi des concentrations plus fortes de stimulants sont nécessaires pour provoquer leur libération.



**Schéma 2 : Régulation de l'exocytose des granules (adapté d'après Lacy et al, 2006)**

La fusion des granulations avec le phagosome aboutit à une diminution du pH autour de 4 par incorporation d'une ATPase à proton dans la membrane phagosomale et à un déversement du contenu des granulations dans le phagosome. Les granules azurophiles contiennent des hydrolases acides dont le fonctionnement est favorisé par la baisse du pH intraphagosomal, de nombreuses enzymes protéolytiques (élastase et cathepsine G) et des glycosydases capables de digérer les protéines de structures des agents infectieux et mucopolysaccharides ainsi que des protéines cationiques à activité microbicide telles que les  $\alpha$ -défensines et la « Bactericidal Increasing Permeability Protein » (BIP). Les granules spécifiques contiennent la lactoferrine qui déprive les microorganismes des nutriments essentiels, enfin les granules contiennent aussi des lysozymes et collagénases qui détruisent les composants de l'enveloppe cellulaire. La plupart de ces protéines sont chargées positivement, ce qui augmente leur capacité de liaison à la surface des cellules.

Les enzymes hydrolytiques participent à la digestion des microorganismes morts et des cellules hôtes endommagées. Les sérines protéases telles que l'élastase et la cathepsine G hydrolysent les protéines contenues dans l'enveloppe bactérienne et le lysozyme dégrade les composants lipopolysaccharidiques. La cathepsine G et le lysozyme peuvent également contribuer à la mort bactérienne par un mécanisme indépendant de leur activité enzymatique. La BIP se fixe rapidement à la surface interne de la membrane bactérienne (surtout de type gram négatif), induit une augmentation de la perméabilité membranaire aux substances hydrophiles et active des enzymes qui dégradent les phospholipides et les peptidoglycanes membranaires. Ils altèrent les propriétés des membranes bactériennes et inhibent la respiration bactérienne. L'azurocidine est active contre les bactéries gram-négatives et à un moindre degré, contre les grams positifs et les champignons. La lactoferrine possède deux sites de fixation du fer. Ce fer est nécessaire aux protéines bactériennes comme la catalase et les cytochromes. La croissance des bactéries privées de fer est diminuée. Les  $\alpha$ -défensines, qui constituent 30-50% des protéines des granules azurophiles, sont de petits peptides antimicrobiens très basiques (poids moléculaire < 4000 Da) qui sont cytotoxiques contre les bactéries, champignons et virus. Elles peuvent former des canaux membranaires dans les bicouches lipidiques des bactéries, modifiant leur perméabilité membranaire.

#### b) L'élastase du neutrophile

Activité antibactérienne de l'élastase : Protéase impliquée dans cette étude, l'élastase du neutrophile est une glycoprotéine de 218 acides aminés retrouvée également au niveau des autres granulocytes et des monocytes. Elle clive préférentiellement des liaisons peptidiques au niveau des valines. L'élastase joue un rôle central dans les protéolyses extracellulaires réalisées par les neutrophiles. Elle a la capacité de dégrader directement la protéine membranaire OmpA de E.Coli *in vitro* et de cliver la flagelline qui normalement possède des propriétés pro-inflammatoires (Lopez-Boado YS et al, 2004). L'incubation d'E.Coli avec l'élastase du neutrophile entraîne la perte d'intégrité et la lyse de ces bactéries. Les souris déficitaires en élastase du neutrophile ont une susceptibilité accrue aux infections par des bactéries Gram<sup>-</sup> et notamment des entérobactéries (bactéries provenant de la flore intestinale) (Weinrauch Y et al, 2002).

L'élastase et les protéines de l'hôte : L'élastase peut néanmoins également cibler des protéines de l'hôte. Elle hydrolyse une grande variété de macromolécules de la matrice extracellulaire, de protéines plasmatiques, de médiateurs inflammatoires et de récepteurs à la surface des cellules. L'élastase du neutrophile module ainsi directement la réponse inflammatoire. En effet, il a notamment été montré qu'elle avait la capacité de cliver le CXCL12, d'induire la protéolyse du CCL3, dégrader le TNF (Scuderi P et al, 1991) et d'inactiver l'IL6 (Bank U et al, 1999) afin de réduire l'activité

chimiotactique et la réponse inflammatoire (Rao RM et al, 2004). L'élastase clive également les PARs 1, 2, 3 et active ainsi ces récepteurs augmentant l'inflammation et la douleur (Loew D et al, 2000 ; Cumashi A et al, 2001 ; Zhao P et al, 2015). Plusieurs études indiquent que l'élastase du neutrophile a une contribution dans des inflammations chroniques des voies respiratoires en induisant la production de mucine par les cellules épithéliales (Fischer B et al, 2000). Dans un modèle murin de BPCO (Broncho-pneumopathie chronique obstructive), les souris exposées à l'élastase développent une BPCO aggravée avec une inflammation soutenue du poumon. L'activité de phagocytose des macrophages isolés de ces souris est réduite (Ganesan S et al, 2012).

Des publications récentes suggèrent que l'élastase a la capacité de rentrer à l'intérieur de ces cellules ciblées. Ainsi, l'élastase est en mesure d'activer les calpaïnes intracellulaires qui à leur tour d'entraînent la dégradation de la protéine CFTR responsable des flux d'ions chlorure (Le Gars M et al, 2013). De plus, il a été montré que l'élastase a accès à des compartiments endosomaux de cellules cancéreuses du poumon où elle a la capacité de dégrader le récepteur intracellulaire de l'insuline et favorise la croissance tumorale (Houghton AM et al, 2010).

*Inhibition endogène de l'élastase circulante* : Des inhibiteurs endogènes de l'élastase circulent dans le plasma réduisant l'activité de la protéase une fois libérée dans le milieu extracellulaire. L' $\alpha$ 1-antitrypsine (également nommée  $\alpha$ 1-Protease inhibitor) est synthétisée par les hépatocytes. Il s'agit de l'inhibiteur endogène de l'élastase le plus abondant dans le sérum (1,2 à 2 mg/ml chez les personnes saines) (Jeppsson JO et al, 1978) et augmente durant les phases d'inflammation aiguë. L'inhibiteur fait partie de la famille des serpins, et comme la majorité d'entre elles, l' $\alpha$ 1-antitrypsine inhibe de manière irréversible l'élastase en s'y fixant de manière covalente (Kang UB et al, 2004). L' $\alpha$ 1-antichymotrypsine est une glycoprotéine également synthétisée par les hépatocytes et sécrétée dans le sérum à une concentration de 0,25 mg/ml (Calvin J et al, 1986). Elle inhibe également l'élastase de manière irréversible en formant un complexe covalent.

Les monocytes et neutrophiles expriment eux aussi deux types d'inhibiteurs de l'élastase, PI6 (SerpineB6) et PI9 (SerpineB9) exprimés au niveau de leur cytoplasme et ayant pour rôle d'inhiber l'élastase cytoplasmique (Remold-O'Donnell E et al, 1989 ; Thomas RM et al, 1991).

Les SLPI (Secretory leukocyte Protease inhibitor) sont de petites protéines de 107 acides aminés trouvés dans de nombreux fluides biologiques mais également synthétisées par les phagocytes (Sallenave JM et al, 1997). Il s'agit là aussi d'un inhibiteur irréversible de l'élastase du neutrophile (Boudier C et al, 1989).

Enfin, l'élaïne, une protéine non glycosylée de 6 kDa est appelée « inhibiteur spécifique de l'élastase ». Elle interagit avec l'élastase via son site actif et est capable d'inhiber l'élastase associée



à la membrane des neutrophiles. Outre sa capacité à inhiber l'élastase, l'élafine a également la capacité de se lier et d'immobiliser le LPS (McMichael JW et al, 2005).

c) Le système de défense dépendant de l'oxygène : la NADPH oxydase

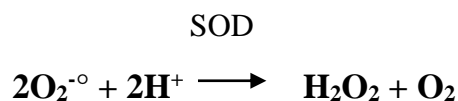
Lorsque les neutrophiles sont stimulés par des agents pro-inflammatoires, ils produisent rapidement des molécules dérivées de l'oxygène appelées formes réactives de l'oxygène (FRO) issues de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Ces FRO comprennent notamment le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et le singulet d'oxygène ( $^1O_2$ ) qui exercent une activité bactéricide et fongicide. La production de FRO est accompagnée d'une augmentation de la consommation d'oxygène, de glucose et de son catabolisme par la voie des pentoses phosphates, elle est appelée aussi « explosion oxydative ». Cette voie métabolique de l'oxygène est insensible au cyanure et donc indépendant de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, lorsque les FRO sont produites de façon excessive ou de manière inappropriée, elles induisent des lésions tissulaires graves. La production des FRO nécessite donc une régulation fine.

d) FRO produites par les phagocytes activés

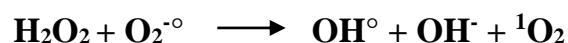
L' $O_2^{\cdot-}$  qui est à l'origine des autres FRO formées est produit par un complexe enzymatique membranaire (NADPH oxydase) qui catalyse la réduction monovalente de l'oxygène aux dépens du NADPH (Babior BM et al, 1978). Elle sera décrite en détail dans un chapitre suivant.



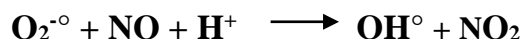
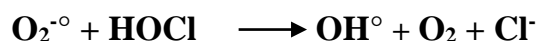
Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est formé par dismutation spontanée de l' $O_2^{\cdot-}$  (en pH acide) ou catalysé par une enzyme le superoxyde dismutase (SOD).



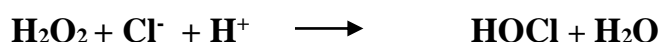
$H_2O_2$  et  $O_2^{\cdot-}$  sont des composés importants de la bactéricidie dépendante de l'oxygène. L'effet toxique de ces composés est dû en partie à leur capacité à former des espèces réactives de l'oxygène. Par exemple  $H_2O_2$  et  $O_2^{\cdot-}$  peuvent interagir par la réaction de Haber-Weiss en présence d'un métal de transition et donner naissance au radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$  et au singulet d'oxygène



Le radical hydroxyle peut être également formé par interaction de l' $O_2^{\cdot-}$  avec l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) ou le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ )



Les deux réactions précédentes ne nécessitent pas de métal de transition. L'acide hypochloreux et le monoxyde d'azote sont produits par l'action d'une myéloperoxidase et la nitrique oxyde synthétase, respectivement. La myéloperoxidase utilise le  $\text{H}_2\text{O}_2$  formé durant l'explosion oxydative pour produire de larges quantités d'acide hypochloreux.

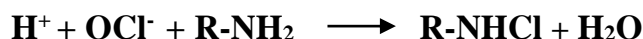


Le HOCl peut pénétrer à l'intérieur des bactéries et entraîne la chlorination des molécules. Il est notamment très réactif sur les acides aminés bloquant toute activité enzymatique. Il bloque ainsi la synthèse d'ATP (Albrich JM et al, 1981), oxyde les résidus méthionine des protéines membranaires et cytosoliques des bactéries, bloque leur prolifération et induit leur mort.

Le singulet d'oxygène pourrait également être formé par réaction de HOCl et  $\text{H}_2\text{O}_2$



Une grande partie de l'acide hypochloreux est cependant convertie en chloramine, également très toxique.



e) Agents stimulants la production des FRO par le neutrophile

Outre les agents particuliers (bactéries, levures, complexe antigène-anticorps), divers groupes d'agents solubles ont la capacité de stimuler la production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$  par les neutrophiles. Ces agents incluent des agonistes des récepteurs chimiotactiques tels que le peptide d'origine bactérienne f-Met-Leu-Phe, fMLP (Williams LT et al 1977), des molécules hydrophobes qui s'intercalent et désorganisent la membrane plasmique tels que les rétinoïdes (Robinson JM et al, 1987) et des agents pharmacologiques qui activent des enzymes spécifiques impliquées dans la cascade d'activation des cellules tel que l'acétate de phorbol myristate (PMA), ou encore le fluorure d'aluminium ( $\text{AlF}_4^-$ ) (Curnutte JT et al, 1979, Robinson JM et al, 1985, Hartfield PJ et al, 1990). Ce dernier groupe d'agents a été particulièrement utilisé pour décortiquer les différentes étapes de la cascade d'activation qui aboutit à la production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$  par les neutrophiles. Par exemple, certains promoteurs de tumeurs, comme le PMA, qui activent directement les PKC entraînent une production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$  comparable à celle observée lors de la phagocytose (Robinson JM et al, 1985). De même, l' $\text{AlF}_4^-$  active les

protéines G trimériques couplées aux récepteurs chimiotactiques (Sondek J et al, 1994), tout comme le mastoparan qui est un peptide de venin de guêpe qui mime la queue C-ter des protéines G trimériques (Perianin A et Snyderman R, 1989). L'ionophore calcique A23187 ou l'ionomycine permettent d'élever artificiellement le taux de calcium intracellulaire. Les deux agents plus couramment utilisés pour l'étude de l'explosion oxydative sont le fMLP et le PMA. Les autres agents pharmacologiques, bien qu'étant de plus faibles stimulants, sont utiles pour d'identifier les étapes transductionnelles qui seraient défailantes dans les neutrophiles issus de patients.

f) Les NADPH oxydases

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique composé de différentes protéines, chacune représentant des propriétés particulières. L'existence d'une consommation d'oxygène par les neutrophiles incubés avec des bactéries était connue de longue date (Baldrige CW and Gerard RW, 1933) mais il a fallu attendre les travaux de Rossi et collaborateurs en 1972 (Rossi F et al, 1972) pour découvrir l'enzyme responsable de ce processus, la NADPH oxydase. Par la suite, ce n'est qu'à partir de 1999 qu'une autre NADPH oxydase a été identifiée et nommée NOX1, appartenant à la famille de NOX, découvertes ensuite. Ces autres NOX vont de NOX 1 à 5 et la famille inclue aussi DUOX 1 et 2. La NADPH oxydase phagocytaire initialement découverte a été rebaptisée NOX2. Plus de détails seront donnés dans les chapitres suivants.

g) Les NET « Neutrophil extracellular traps » ou piégeage extracellulaire par les neutrophiles

La NETose décrit une forme de mort cellulaire séquentielle et caractérisée par la perte d'intégrité des structures intracellulaires (noyau, granules) suivie de la rupture de la membrane plasmique (Brinkmann V et Zychlinsky A, 2012) et la libération dans le milieu extracellulaire du contenu nucléaire de la cellule riche en ADN et histone (NET) sous forme d'un filament d'environ 15 nm de diamètre formant un filet. Ces structures se sont avérées capables de piéger des agents pathogènes et de les détruire. Les protéases granulaires et les histones sont associées aux rubans d'ADN libérés et sont fortement impliquées dans la diminution des facteurs de virulence et l'élimination des bactéries (Brinkmann V et al, 2004).

La formation de NET requiert une signalisation cellulaire qui implique la voie Raf-MEK/ERK1/2 kinase (Hakkim A et al, 2011) et est activable par différents stimuli : Les microorganismes, le LPS, l'acide lipoteicoïque, les plaquettes activées, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-8), les peptides bactériens comme le fMLP ou encore le PMA (Cui BB et al, 2012 ; Kaplan MJ et Radic M, 2012). Les FRO apparaissent comme un élément initiateur important durant la formation de NET puisque cette production est impactée chez les patients portant une mutation affectant l'expression correcte et les fonctions associées au complexe NADPH oxydase,

les CGD (« Chronic granulomatous disease » ou Granulomatose septique chronique) (Bianchi M et al, 2009). Les mécanismes par lequel les FRO régulent la NETose restent controversés ; ils pourraient inactiver les caspases et bloqueraient ainsi l'apoptose qui s'oppose normalement à la NETose (Remijnsen Q et al, Cell Res 2011).

De récents travaux réalisés chez la souris montrent que la génération des NET se produit lorsque la phagocytose d'agents pathogènes est impossible (phagocytose frustrée), notamment en raison de leur taille (Branzk N et al, 2014). Les auteurs proposent que lorsqu'un pathogène est trop gros pour être englobé, alors l'élastase est libérée dans le milieu extracellulaire mais aussi vers le noyau où elle participe à la décondensation de la membrane qui enclenche la NETose. Enfin, il a récemment été montré que des neutrophiles vivants sont également capables de générer des NET. Dans ce cas, ce n'est pas de l'ADN nucléaire libérée mais de l'ADN mitochondrial (Yousefi S et al, 2009). L'implication de l'autophagie et mTOR dans la génération des NET est décrite dans le chapitre 5.

## 1.4 La production de cytokines

Les neutrophiles sont capables de libérer de petites quantités de cytokines pro-inflammatoires qui sont amplifiées par le grand nombre de neutrophile au niveau de foyer inflammatoire et jouent un rôle crucial dans l'activation et la régulation du système immunitaire (Cassatella MA, 1999). Le Schéma 3 résume quelques cytokines qui peuvent être potentiellement produites par les neutrophiles, basé sur des travaux réalisés sur l'expression de gènes, l'immunohistochimie ou encore des tests ELISA.

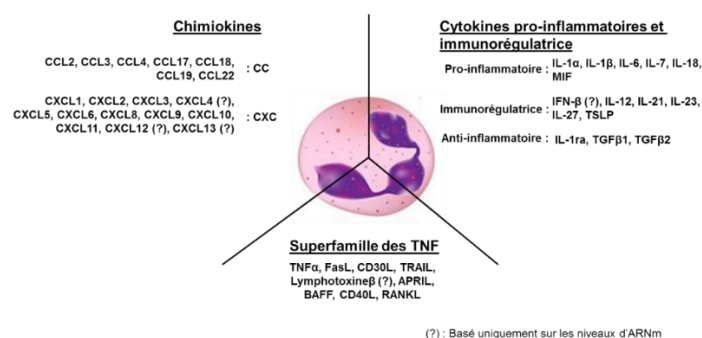


Schéma 3 : Les cytokines produites par les neutrophiles (Adapté d'après Tecchio et al, 2014)

## 1.5 Autres fonctions liées au neutrophile

### 1.5.1 Présentation d'antigènes

De nombreux travaux réalisés chez la souris ont initialement fait état d'une migration active des neutrophiles vers les ganglions lymphatiques depuis le site d'infection par *Mycobacterium bovis* (Abadie V et al, 2005) ou encore dans un modèle d'ovalbumine (Maletto BA et al, 2006). Cela suggère que les neutrophiles peuvent moduler la réponse immunitaire dans le ganglion lymphatique.

Les travaux de Beauvillain et collaborateurs (Beauvillain C et al, 2007) ont montré *in vitro* comme *in vivo* que le neutrophile était capable d'internaliser un agent exogène l'ovalbumine et le présenter sur le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) afin d'entraîner l'activation et la prolifération de lymphocytes T CD8+. Leurs expériences *in-vitro* suggèrent également que le neutrophile est plus efficace que les macrophages à réaliser cette tâche et plus rapide que les cellules dendritiques et macrophages. Devant le nombre de neutrophiles engagés durant la réponse inflammatoire, ils peuvent constituer une cible de choix afin d'entraîner l'activation des lymphocytes T cytotoxiques durant les vaccinations.

Il a également été montré que le neutrophile exprime le CMH de classe II et les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 à l'instar des cellules dendritiques (Hänsch GM et al, 2003). Il a donc logiquement été mis en évidence que le neutrophile était capable d'induire, *in vitro*, la prolifération de lymphocyte T CD4+ via le CMH de classe II, suggérant ainsi qu'ils pouvaient agir comme des présentateurs professionnels d'antigène afin d'activer le système immunitaire adaptatif (Clushaw S et al, 2008). Des expériences similaires *in vitro* (Abi Abdallah DS et al, 2011) ont pu compléter le modèle en montrant que ces neutrophiles induisaient la prolifération et différenciation des lymphocytes T en TH1 et TH17 pro-inflammatoires.

### 1.5.2 La modulation de l'inflammation via l'hypoxie

De plus en plus de données suggèrent que le neutrophile joue un rôle à tous les stades de l'inflammation, depuis l'initiation jusqu'à l'arrêt en passant par la modulation du niveau de cette inflammation. De récents travaux ont montré que l'activité de la NADPH oxydase participerait à la résolution de l'inflammation de l'intestin. En effet, Campbell et collaborateurs (Campbell EL et al, 2014) montrent que la production de FRO par la NADPH oxydase des neutrophiles consomme l'oxygène environnant et induit un microenvironnement hypoxique pauvre en oxygène *in vivo*. L'expression du facteur HIF de cellules épithéliales de l'intestin est stabilisée et permet la résolution de l'inflammation en augmentant la sécrétion de mucus protecteur. L'importance de la NADPH oxydase est attestée par le fait que la résolution de l'inflammation intestinale est fortement réduite chez des modèles de souris CGD incapable de produire des FRO. Cependant, ces conclusions

importantes sont propres à l'intestin où l'organe possède sa propre fonction de barrière. Cette déplétion de l'oxygène environnant via l'activité de la NADPH oxydase du neutrophile pourrait également se produire au niveau d'autres organes en état d'inflammation mais avoir des conséquences différentes. Or, plusieurs travaux ont montré que HIF et les conditions hypoxiques prolongent la survie des neutrophiles (Walmsley SR, 2005) et donc, à l'inverse, entretient l'inflammation (Thompson AA et al, 2014).

### **1.5.3 Le neutrophile dans les tumeurs**

#### **a) L'élastase du neutrophile favorise la croissance tumorale.**

Historiquement, les PN sont considérés comme la première ligne de défense cellulaire anti-infectieuse. Cependant, de nombreux travaux indiquent que les PN infiltrent différents types de tumeurs, et leur présence est considérée comme un mauvais pronostic (Houghton AM et al, 2010). La présence des PN dans les adénocarcinomes pulmonaires a été associée à la production d'un puissant chimioattractant des PN, l'IL8, par ces cellules (Bellocq A et al, 1998). Plusieurs travaux proposent que l'élastase du neutrophile a la capacité d'induire directement la prolifération des cellules cancéreuses pulmonaires via un mécanisme complexe comportant l'entrée de l'élastase dans les cellules via les endosomes et dégradation du récepteur de l'insuline (IRS) lié à son partenaire, la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-kinase. Cette dégradation favorise ainsi l'activité prolifératrice de la PI3-Kinase (Houghton AM et al, 2010 ; Yamauchi T et al, 1998)

#### **b) Rôle anti- ou pro-tumoral des neutrophiles.**

A l'inverse de travaux montrant une fonction pro-tumorale des neutrophiles, il existe plusieurs études rapportant leurs rôles anti-tumoraux, la plupart du temps avec des lignées cellulaires ou dans des essais thérapeutiques impliquant notamment une déplétion des PN (Gregory AD et al, 2011) et des anticorps dirigés contre les cellules tumorales (Albanesi M et al, 2013). Ces études indiquent que les neutrophiles qui infiltrent les tumeurs suite à l'inhibition du TGF- $\beta$  (Fridlender ZG et al, 2009) ou son activation immunologique, deviennent hyper-segmentés et peuvent prendre un phénotype plus N1 tumoral cytotoxique, où ils acquièrent le potentiel de tuer les cellules tumorales et d'inhiber leur croissance (Di Carlo E et al, 2001 ; Hicks AM et al, 2006). Les mécanismes anti-tumoraux des PN ne sont pas clairement définis. Cependant, d'autres travaux montrent que le PN est capable de tuer directement des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Katano M et Torisu M, 1982), que leur production de FRO est capable d'induire la mort de cellules tumorales (Fridlender ZG et al, 2009 ; Lichtenstein A et al, 1989 ; Zivkovic M et al, 2007). Enfin, d'autres mécanismes incluent la capacité des PN à induire l'apoptose des cellules associée au Ligand de Fas et une cytotoxicité cellulaire médiée par des anticorps dirigés contre le récepteur EGF, panitumumab and zalutumumab (Schneider-Merck

T et al, 2010).

## **1.6 Apoptose du neutrophile et résolution de l'inflammation**

Une inflammation normale consiste en la reconnaissance de l'agent agresseur, son élimination mais également le retour à un état non inflammatoire. Chez les neutrophiles, ce retour se traduit par une diminution de leur recrutement au foyer inflammatoire, une suppression de leur activité mais également leur apoptose et élimination par les macrophages. L'apoptose du neutrophile est un point critique pour la réussite de la résolution de l'inflammation. Elle est hautement régulée par un processus qui fait intervenir des facteurs de mort cellulaire comme le ligand de Fas (FasL), le TNF- $\alpha$ , les caspases, la famille des Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), les FRO, les calpaïnes ainsi que le pathogène. Cette mort des neutrophiles *in situ* a de nombreux bénéfices puisqu'elle réduit la quantité de chimiokines, réduit la réponse aux peptides chimioattractants, la capacité à phagocyter ainsi qu'à entreprendre l'explosion oxydative et la dégranulation. Lorsque les macrophages phagocytent les neutrophiles apoptotiques leur profil cytokinique change et ils ont tendance à sécréter des médiateurs anti inflammatoires tels que IL-10, l'IL-13 ou encore le TGF- $\beta$  (Kantari C et al, 2008).

Des dérèglements de cette apoptose et de la résolution de l'inflammation peuvent entrainer le développement de nombreuses pathologies. Ces dernières feront l'objet du chapitre VI.

## 2 - Les récepteurs liés aux fonctions de défense du neutrophile

Les différentes fonctions des PN, à savoir adhérence, migration dirigée, dégranulation, explosion oxydative, phagocytose/englobement, production de médiateurs (cytokines, lipides chimiotactiques) et NET, sont induites suite à l'interaction de stimulants avec des récepteurs membranaires spécifiques. Les récepteurs impliqués dans l'englobement des agents pathogènes, récepteurs d'opsonines et d'immunoglobulines, ont déjà été décrits dans le premier chapitre sur les fonctions des PN. Dans ce chapitre, seront décrits deux types de récepteurs les plus étudiés des PN et qui les alertent de la présence de pathogènes, les TLR et les récepteurs chimiotactiques. Parmi ces derniers, l'accent sera mis sur le récepteur fPR des peptides N-formylés produits par les bactéries et mitochondries. Ce récepteur est particulièrement important car il est abondamment exprimé et polyfonctionnel, c'est à dire capable d'induire toutes les activités de défense des PN sauf l'englobement. De plus, c'est le récepteur le plus étudié du point de vue transductionnel, en raison de sa puissance qui permet d'identifier des activités difficilement détectables dans d'autres types cellulaires, notamment TOR, qui fait l'objet de notre étude expérimentale.

### 2.1 Les « Pattern Recognition Receptor » (PRR) du neutrophile

Les « Patterns Recognition Receptor » (PRR) désignent les familles de récepteurs utilisés par l'immunité afin de reconnaître des motifs structurels sur des pathogènes (les PAMPs ou **P**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**attern) et les signaux de danger produits lors de dommages tissulaires ou dans des conditions de stress (les DAMPs ou **D**anger-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns). Cette grande variété de récepteurs permet une réponse immunitaire adaptée aux pathogènes mais également au niveau de danger qu'il fait peser sur la cellule ciblée. A titre d'exemple, la reconnaissance des Salmonelles par des récepteurs extracellulaires du neutrophile déclenche la production de cytokines inflammatoires alors que lorsque sa reconnaissance s'opère via des récepteurs intracellulaires tels que les NLRs, cela déclenche le programme de mort de la cellule (Broz P et al, 2012).

Le neutrophile possède une large famille de PRR permettant de reconnaître une très large variété de pathogènes (Schéma 4).



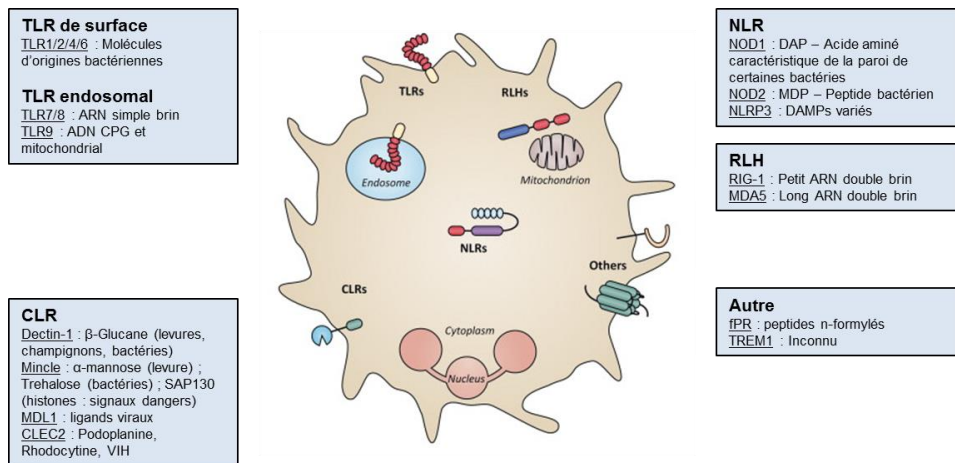


Schéma 4 : Les PRR à la surface du neutrophile (adapté à partir de Christina et al, 2013)

## 2.2 Les « Toll-Like » receptor (TLR)

### 2.2.1 Généralités : Structure et expression

Les TLR sont exprimés à la surface des cellules et sur les membranes des endosomes et lysosomes. Ils reconnaissent avant tout des PAMP d'origine bactérienne, fongique et virale. Les TLR sont des récepteurs transmembranaires qui sont composés d'un domaine N-terminal extracellulaire permettant la reconnaissance du ligand, d'un seul domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire qui permet la transduction du signal.

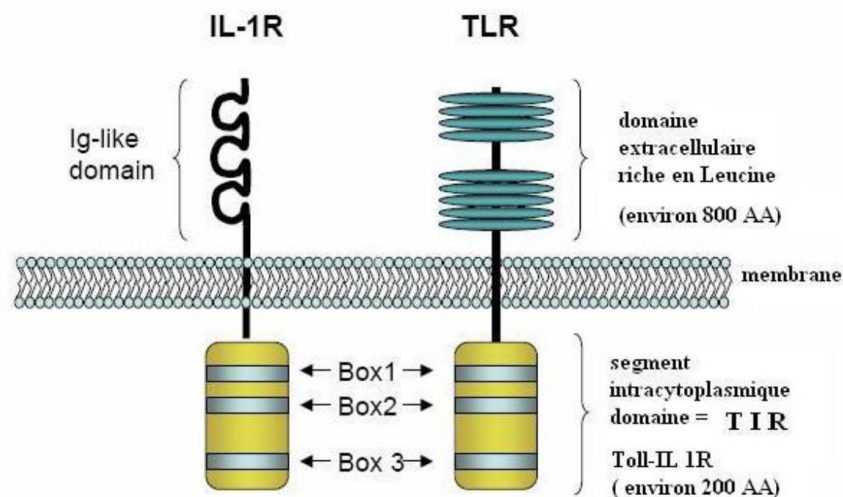


Schéma 5 : Structure des TLR

Le domaine extracellulaire, d'environ 800 acides aminés, est composé de répétitions riches en leucines lui donnant son nom de LRR pour « Leucin-Rich-Repeats ». Il est impliqué dans la reconnaissance des pathogènes et l'initiation de la signalisation du TLR (Akira S, 2003). Chaque TLR

diffère par le nombre et la répartition de ses répétitions riches en leucines, c'est ce qui garantit aux TLR leur sélectivité vis-à-vis des molécules reconnues (Bell JK et al, 2003). Le domaine intracellulaire composé de 150 à 200 acides aminés, est similaire à celui du récepteur à l'IL-1. C'est de là qu'il tire son nom TIR (Toll/IL-1R/R) (Imler JL et al, 2001). Trois de ces séquences sont très conservées (Box 1, 2 et 3) et elles sont impliquées dans la transduction du signal (Xu Y et al, 2000).

Subdivisés en 12 classes chez la souris et 10 classes chez l'homme allant du TLR1 au TLR10, leur expression varie en fonction du type cellulaire. Ainsi, les cellules immunitaires en particulier les monocytes, les neutrophiles, et les cellules présentatrices d'antigènes expriment une grande variété de TLR (Janeway CA et al, 2002). Les neutrophiles possèdent une large panoplie des TLR à l'exception du TLR3 et 10 et l'expression du TLR7 est controversée, elle est retrouvée dans les neutrophiles de souris mais semblerait absente des neutrophiles humains (Hayashi F et al, 2003, Janke M et al, 2009). Les cellules endothéliales, qui sont en première ligne lors d'agressions par des pathogènes, expriment également des TLR, à titre d'exemple les cellules endothéliales du foie expriment le TLR4 et sont donc sensibles au LPS (Jagavelu K et al, 2010).

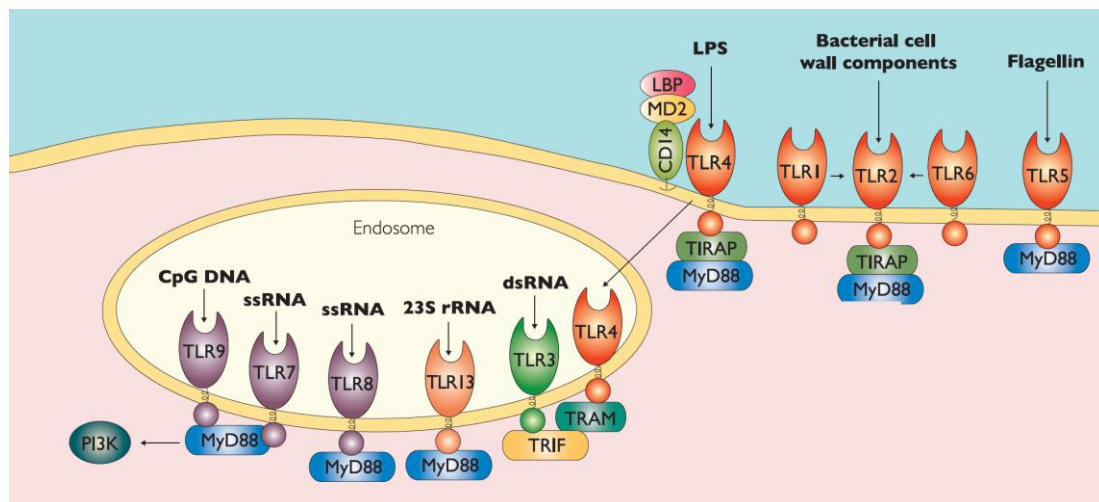


Schéma 6 : Répartition subcellulaire et ligands des TLR (Adapté de InvivoGen, 2015)

La répartition subcellulaire varie selon les TLR et est en adéquation avec le type de pathogène qu'ils sont censés reconnaître. Ainsi, on retrouve les TLR1, 2, 4, 5 et 6 associés à la membrane plasmique et principalement dirigés contre des composants exprimés à la surface des bactéries (LPS des Gram<sup>-</sup>, composant bactériens, flagelline). Les TLR 3, 7, 8 et 9 sont exprimés au niveau des endosomes et sont dirigés contre des acides nucléiques d'origine virale et bactérienne, ils permettent à la cellule de répondre à des pathogènes l'ayant envahi. A noter que le TLR4 est à la fois exprimé à la surface des cellules mais aussi dans les endosomes.

## 2.2.2 TLRs et ligands endogènes

Bien que les TLR soient connus comme les senseurs de l'immunité, ils sont capables également de détecter des ligands endogènes. Il s'agit d'un groupe de molécules dérivant des tissus ou cellule du soi. La majorité d'entre eux proviennent de la matrice extracellulaire, ou de protéines nucléaires intracellulaires comme HMGB1. Les TLR2 et 4 sont ceux qui reconnaissent la plus grande variété de ligands endogènes.

Dans les conditions physiologiques ces ligands endogènes des TLR et leurs récepteurs sont localisés dans différents compartiments cellulaires et ne sont pas supposés interagir. A l'inverse, dans un cadre pathologique ces ligands sont libérés passivement depuis un tissu en état d'inflammation, blessé, de cellules mortes ou sont directement libérés par des cellules activées. Ces ligands sont alors considérés comme des molécules de détresse qui alertent le système immunitaire inné (Seong SY et al, 2004) et rentrent donc dans la catégorie des DAMPs.

TLR	Ligands
TLR2	Biglycan, endoplasmine, HMGB1, HSP60, HSP70, myosine cardiaque, Hyaluronane, cristaux d'urate
TLR3	ARNm
TLR4	Biglycan, CD138, Chaîne A de $\alpha$ -crystalline, $\beta$ -defensine, endoplasmine, fibrogène, fibronectine, sulphate d'heparan, HMGB1, HSP22, HSP60, HSP70, HSP72, Hyaluronane, cristaux d'urate, OxPAPC, Resistine, Protéine S100, SP-A, Tenasine-C
TLR7	ARN, petits ARN interférents
TLR8	Myosine cardiaque, petits ARN interférents
TLR9	ADN, HMGB1

Tableau 2 : Ligands endogènes des TLR (adapté à partir de Yu et al, 2010)

## 2.2.3 Fonctions effectrices associées à l'activation des TLR

Le système immunitaire inné est organisé afin de différencier le soi du non soi et d'engendrer des réponses appropriées telles que l'élimination des pathogènes ou la détection de cellules nécrotiques. La famille des TLR joue un rôle central dans cette reconnaissance des pathogènes par les neutrophiles (Underhill DM et al, 2002). Les TLR mobilisent un adaptateur commun MYD88 sauf le TLR3 et ILR1. Celui-ci contribue à l'activation de nombreuses voies de signalisation comme les MAP-kinases (Takeuchi O et Akira S, 2010). Beaucoup de travaux se sont historiquement attachés à évaluer le rôle du TLR4 via l'utilisation de LPS purifié. Ils ont montré que le TLR4 avait la capacité d'activer les voies MAPK des neutrophiles, d'activer les fonctions de défense des neutrophiles, le clivage de la L-Selectine, l'augmentation de l'expression membranaire du CD11b, la production de formes réactives de l'oxygène et la production de cytokines (Sabroe I et al, 2003). Depuis, il a été

montré que l'activation de tous les TLR présents chez le neutrophile entraîne l'activation des fonctions immunitaires de la cellule.

Fonctions cellulaires	TLR
Dégranulation	TLR1, 2, 4, 5, 6, 8, 9
Phagocytose	TLR1, 2, 4, 5, 6, 8, 9
Explosion oxydative	TLR1, 2, 4, 5, 6, 8, 9
Régulation apoptose	TLR1, 2, 4, 5, 6, 8, 9
Formation de NET	TLR1, 2, 4, 5, 6, 8, 9
Migration	TLR1, 2, 4, 8, 9
Cytokines pro-inflammatoires	TLR1, 2, 4, 5, 6, 8, 9

**Tableau 3 : Les fonctions des neutrophiles associées aux TLR (adapté à partir de Christina et al, 2013)**

Des travaux de l'équipe d'accueil (Makni-Maalej K et al, 2012) ont montré qu'un agoniste des TLR7 et/ou TLR8, le CL097, potentialise l'explosion oxydative des neutrophiles humains stimulés par le fMLP. Le mode d'action du CL097 incluait l'augmentation de l'expression à la membrane plasmique du cytochrome b558 (gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup>), induisait la phosphorylation de p38-MAPK, ERK1/2, PKC $\beta$  et induisait la phosphorylation de la sous unité cytosolique de la p47<sup>phox</sup> sur les Ser-315, 328 et 345 (ces phosphorylations seront décrites dans le chapitre 3). Le ciblage de ces TLR7/8 dans les neutrophiles humains est donc en mesure d'induire une hyperactivation de la NADPH oxydase via l'activation des p38-MAPK, ERK1/2 et PKC. Nous avons tiré profit de cette approche durant notre étude en vue de potentialiser la production de FRO qui était déficitaire dans les neutrophiles de patients cirrhotiques. (Manuscrit 2 de l'étude expérimentale). Ce travail a montré que l'activation de TRL7/8 (CL097, R848) seule est capable de stimuler faiblement l'explosion oxydative des PN, en accord avec des travaux d'autres auteurs (Janke M et al, 2009) et favorise leur réponse induite secondairement par le fMLP.

L'activité transcriptionnelle et traductionnelle a émergé ces dernières années comme une composante essentielle de l'activité des neutrophiles. Plusieurs équipes ont pu alors montrer que l'activation des TLR avait la capacité d'augmenter l'activité transcriptionnelle et traductionnelle des neutrophiles. Ainsi Zimmermann M et collaborateurs ont montré que R848 et CL075, deux agonistes sélectifs du TLR8, avaient la capacité d'induire l'expression de l'ARN messager de l'IL6 et la génération exogène d'IL6 par le neutrophile (Zimmermann M et al, 2015). Ces travaux apportent donc des éclaircissements sur une faculté toujours obscure des neutrophiles mûres à induire une transcription et une synthèse protéique suite à la stimulation du TLR8.

## **2.2.4 Les agonistes des TLR dans les thérapies**

Les agonistes des TLR ont un grand potentiel immunothérapeutique ou comme adjuvant de vaccins, pour le traitement des maladies infectieuses, des cancers ou des maladies auto-immunes. A titre d'exemple, les vaccins contre la fièvre jaune (YF-17D) et Bacille Calmette-Guérin (BCG) sont composés de virus atténués ou de produits bactériens qui activent directement les TLR et activent le système immunitaire. Le vaccin contre la fièvre jaune a la capacité d'activer les TLR2, 7, 8 et 9 (Querec T et al, 2006). Il a été montré que le vaccin BCG diminuait la présentation antigénique des macrophages via le CMH II mais la combinaison du vaccin avec des agonistes des TLR7 et 9 a permis de corriger cet effet négatif (Bakhru P et al, 2014).

Il existe cependant que très peu d'agonistes des TLR approuvés comme traitements cliniques. Les agonistes des TLR3 et 9 ont montré leur capacité à induire une forte réponse IFN- $\alpha$  et à induire la maturation de lignées myéloïdes suppresses de tumeur (MDSC) (Gabrilovich DI et al, 2012). Dans des modèles murins de sepsis néonatal, une défaillance du système immunitaire inné a été observée et associée à une très faible survie. Le traitement de ces souris par des agonistes des TLR4 (LPS) et des TLR7/8 (R848 ou Resiquimod) a permis l'amélioration des fonctions de défense liées au système immunitaire inné et a amélioré la survie des souris (Wynn JL et al, 2008).

## **2.3 Les récepteurs chimiotactiques**

### **2.3.1 Généralités sur les récepteurs chimiotactiques**

Les pathogènes qui envahissent l'organisme et les tissus endommagés sont des sources de chimioattractants solubles exogènes ou endogènes qui servent à recruter les leucocytes et cellules épithéliales afin de participer à la réponse immunitaire et la réparation tissulaire. Les récepteurs chimiotactiques classiques tels que fPR, C5aR, PafR, LTB4R et les récepteurs de chimiokines (MIP, IL8) régulent les paramètres de déplacement cellulaire (adhérence, polarité cellulaire, chimiotactisme, chimiokinèse) mais sont également capables de réguler des fonctions de défense rapide des phagocytes comme la dégranulation, la production de FRO (explosion oxydative), et la synthèse de protéines. Le chimiotactisme est initié par l'activation de récepteurs spécifiques exprimés à la membrane des leucocytes ou cellules épithéliales tels que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs sérines/thréonines kinases (Miller AF et Falke JJ, 2004). Plusieurs paramètres ont été proposés pour définir leur mode d'action, à la fois concernant la concentration des stimulants et les étapes de la cascade de signalisation qui conduisent à la stimulation des différents systèmes contrôlant le chimiotactisme.

Le chimiotactisme du neutrophile est induit de manière optimale par de faibles concentrations d'agonistes proche de la valeur du  $K_d$  (5 à 10 nM pour le fMLP) et qui ne stimulent que très faiblement l'explosion oxydative (Lenoir M et al, 2004). A l'inverse, lorsque les concentrations de ces agonistes augmentent (100-1000 nM pour le fMLP), la migration est fortement réduite alors que la production de FRO ou la dégranulation sont fortement augmentées. Ces différences fonctionnelles supposent des différences de régulations spatiales et temporelles des différentes voies de signalisation communes pour la migration (réseau d'actine) et l'activité de la NADPH oxydase.

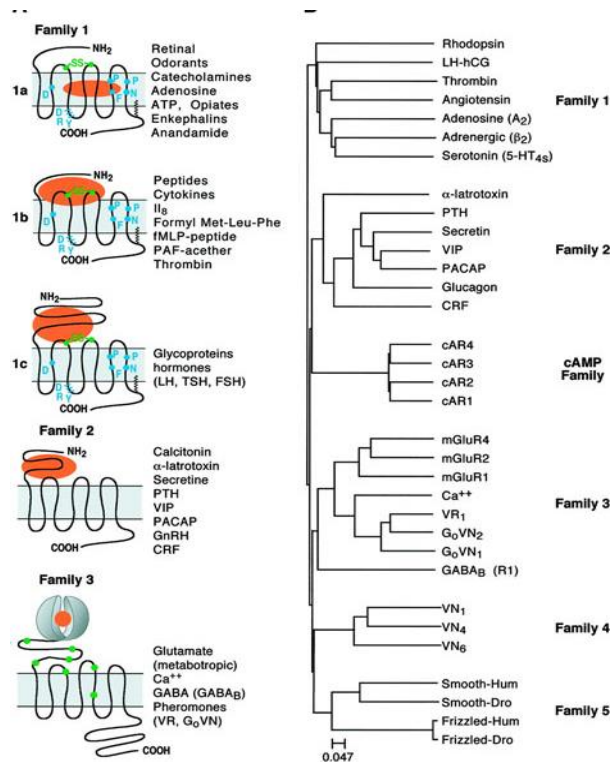
Par ailleurs, pour le cas des RCPG, un même récepteur peut interagir avec plusieurs protéines G trimériques ( $G_i$ ,  $G_q$  et  $G_{13}$ ) et stimuler ainsi différentes voies de signalisation. L'utilisation de toxines qui bloquent spécifiquement l'activation de  $G_i$  (toxine pertussique), ou l'étude de chimères de récepteurs fusionnés à une protéine G donnée, indique que seuls les RCPG couplés aux protéines G de type  $G_i$  sont capables d'induire une migration dirigée des cellules (Brown SL et al, 2006). De plus, la migration dirigée est dépendante de l'activation des sous-unités  $\beta\gamma$  et ne nécessite pas la sous-unité  $G\alpha$  bien que cette dernière stimule également des cascades de signalisation (Neptune ER et al, 1999).

### **2.3.2 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)**

Les récepteurs couplés aux protéines G sont les principaux membres de l'hyper famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Ils forment la plus vaste famille du génome des vertébrés (> 1%) dont un minimum de 600 membres a été répertorié chez l'homme. Principales caractéristiques de ces récepteurs, le fait qu'ils possèdent 7 domaines transmembranaires laissant apparaître sur la face extracellulaire trois boucles ainsi que la queue N-terminale de la protéine impliquée en partie dans le site de liaison du récepteur pour son ligand. A l'inverse, du côté cytosolique, le récepteur comporte également trois autres boucles et la queue C-terminale qui contient des sites de phosphorylation et domaines d'interaction avec de nombreux partenaires, notamment des domaines PDZ. La grande majorité des récepteurs à 7 domaines transmembranaires sont couplés à une protéine G (guanine nucleotide-binding protein) composée d'une sous-unité  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  qui leur donne également le nom de RCPG (récepteur couplé aux protéines G).

La superfamille des RCPG se subdivise en plusieurs classes sur la base de leur séquence primaire et de la localisation du site de liaison des ligands agonistes (Schéma 7). La famille I comprend la majorité des RCPG qui interagissent avec des ligands de petites tailles, dont le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique et la Rhodopsine (Rh). La famille II possède un nombre beaucoup plus restreint de membres dont l'extrémité N-terminale, très grande, constitue le principal site de liaison du ligand,

notamment les cytokines et les chimiokines. La famille III se compose des récepteurs métabotropiques du glutamate, des récepteurs au GABA, et du récepteur au calcium.



**Schéma 7 : Classification des RCPG (Extrait de Bockaert et Pin, 1999)**

Plus récemment une nouvelle classification a été proposée (système GRAFS) regroupant les récepteurs en 6 classes sur la base de leur homologie de séquence et leur similitude de fonctionnement.

L'activation des RCPG par son ligand implique des changements conformationnels du récepteur avec une réorganisation des différents domaines transmembranaires et des différentes boucles (Schéma 8). Cette interaction libère un niveau énergétique suffisant pour entraîner le passage du récepteur à une conformation active et cela le rend accessible à ses différents effecteurs cytoplasmiques permettant notamment une interaction directe avec les protéines G trimériques. L'activation du récepteur permet à la protéine  $G\alpha\beta\gamma$  de libérer son GDP et le GTP se lie pour former une forme active  $G\alpha$ -GTP d'un côté et  $G\beta\gamma$  de l'autre qui interagissent ensuite avec les effecteurs en aval (Revue Oldham WM et Hamm HE, 2006).



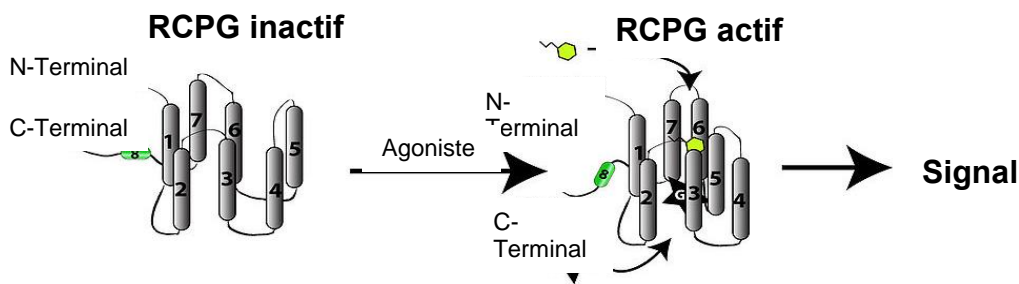


Schéma 8 : Activation des RCPG (adapté de Wikimedia Commons, 2010)

Dans les neutrophiles, les RCPG classiques (liant le fMLP, le C5a ou le Paf par exemple) contrôlent une grande variété de réponse incluant le chimiotactisme, la production de FRO ou encore la dégranulation. Le premier RCPG à être caractérisé biochimiquement fut le N-formyl peptide Receptor (fPR) (Showell et al, 1976). Il fut cloné en 1990 par F. Boulay à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) des cellules leucémiques promyélocyaires HL-60 (Boulay F et al, 1990). Le fPR est le récepteur le plus étudié des neutrophiles, aussi bien sur le plan fonctionnel que de la signalisation intracellulaire.

## 2.4 Les formyl Peptide Receptor (fPR)

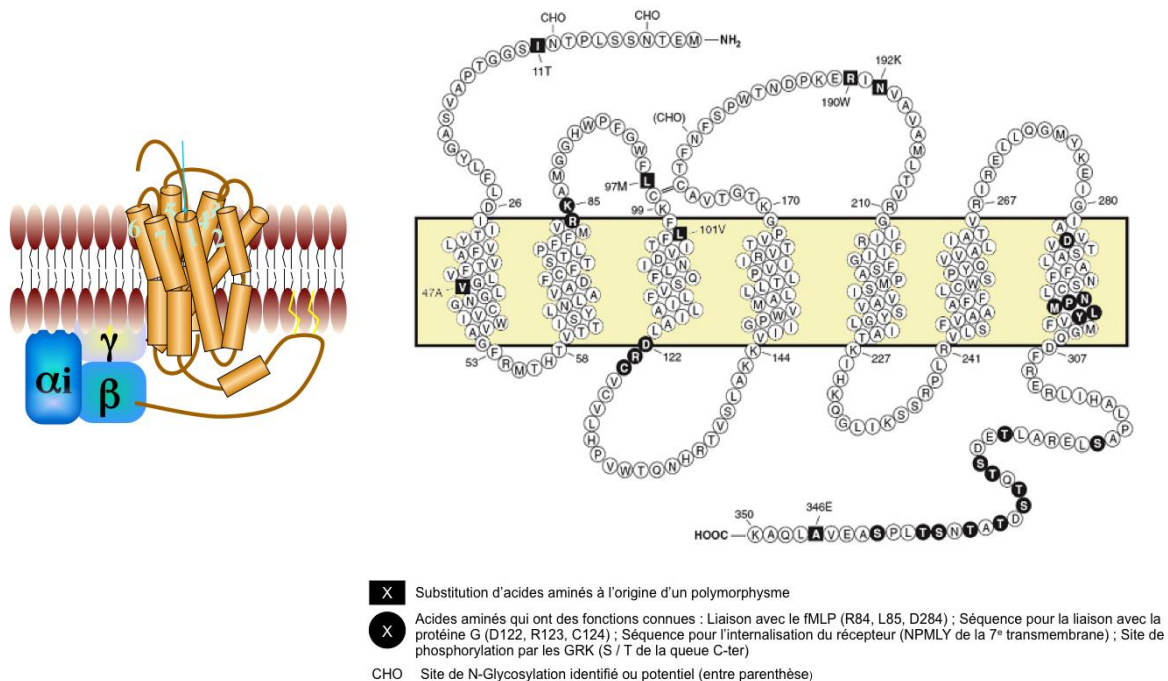
Le N-formyl peptide receptor (fPR) joue un rôle clé dans l'immunité. Dans les lignées cellulaires transfectées, le fPR lie le tri-peptide formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) avec une haute affinité ( $K_d < 1\text{nM}$ ). Dans ces modèles, un signal calcique et du chimiotactisme ont été observés pour des concentrations de fMLP comprises entre 1 pM et 1 nM.

### 2.4.1 Famille et structure

Le fPR est structuré comme un récepteur à 7 domaines transmembranaires laissant apparaître des boucles extra et intracellulaires et il est couplé à une protéine G, ici  $G_i$ . Le récepteur est composé de 350 acides aminés. Le fPR s'inscrit dans une famille de récepteurs homologues qui jouent tous un rôle dans la défense contre les pathogènes lorsqu'ils sont exprimés sur les cellules immunitaires. Trois gènes ont été identifiés codant pour les 3 homologues : fPR1 (FPR), fPR2 (FPRL1) qui code pour une protéine de 351 acides aminés et présente 69% d'homologie avec le fPR et fPR3 (FPRL2) qui ne partage que 56% d'homologie avec FPR. Seuls le fPR1 et fPR2 sont exprimés dans le neutrophile humain (Kim SD et al, 2009). Ils partagent une forte homologie structurale au niveau des trois boucles cytoplasmiques mais divergent au niveau de la queue C-terminale.



La conformation du fPR est stabilisée par plusieurs interactions entre acides aminés : Arg84-Arg210, Lys85-Arg210 et qui aident à déterminer la structure tridimensionnelle du récepteur. Les boucles extracellulaires 1 et 2 sont reliées entre elles par un pont disulfure entre les Cys98-Cys164.



**Schéma 9 : Structure primaire et 3D prédictive du formyl-peptide-récepteur fPR1 (adapté à partir de <http://atlasgeneticsoncology.org>)**

La queue N-terminale, les boucles extracellulaires 1 et 2 participent au site de liaison du récepteur pour ses ligands. La boucle extracellulaire 1 joue un rôle important dans la liaison du récepteur avec le fMLP puisqu'il a été montré le rôle majeur des résidus Arg84 et Lys85 de la première boucle dans cette liaison (Radel SJ et al, 1994).

La partie intracellulaire du fPR est fortement impliquée dans la transduction du signal consécutif à la liaison du récepteur avec son agoniste. La queue C-terminale et la 2<sup>e</sup> boucle intracellulaire sont fortement impliquées dans la liaison du récepteur avec la protéine G trimérique. En effet, un motif DRC au niveau de la boucle intracellulaire 2 composé des acides aminés D122, R123 et C124 est capable de lier la protéine G (Schreiber RE et al, 1994 ; Miettinen HM et al, 1999). Le rôle de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire est plus controversé puisqu'elle apparaît importante dans la liaison des protéines G avec les récepteurs adrénergiques (O'Dowd BF et al, 1988) mais limitée concernant le fPR (Prossnitz ER et al, 1993).

Le fPR possède 3 résidus asparagines glycosylés : Asn4, Asn10 et Asn179 importants pour la bonne expression fonctionnelle du récepteur. En effet, les récepteurs fPR mutés dépourvus de glycosylation sur leur queue N-terminale ou bien sur la boucle e12 n'ont montré aucune activité et

aucune aptitude à stimuler la liaison entre la protéine  $G_i$  et le  $GTP\gamma S$ . En outre la liaison du fMLP avec ces récepteurs mutés a été également grandement affectée suggérant que ces glycosylations joueraient un rôle important dans la liaison du récepteur avec son ligand (Wenzel-Seifert K et al, 2007).

## 2.4.2 Les ligands du fPR

Le fPR se lie avec une haute affinité à des peptides N-formylés initialement trouvés chez les bactéries et issus de la mitochondrie (0,1-1 nM pour le fPR1). D'autres molécules ont également la capacité de se lier au récepteur fPR. Elles peuvent provenir de pathogènes mais également dériver de l'hôte ou être synthétiques. Le Tableau 4 ci-après résume les différents agonistes qui peuvent se lier aux fPR.

Le fPR a longtemps été considéré comme un récepteur de la lutte antimicrobienne, car les bactéries demeurent la première source biologique d'agonistes N-formylés pour le fPR. Ces peptides, dont le représentant fMLP a été largement utilisé, stimulent le chimiotactisme des phagocytes et d'autres fonctions cytotoxiques (explosion oxydative, dégranulation) qui contribuent à la destruction des bactéries. Un fragment du peptide non formylé produit par *Helicobacter pylori*, Hp(2-0), a été identifié comme agoniste de FPRL1 et FPRL2 (Betten A et al, 2001). Chez l'homme, deux allèles mutés du fPR, F110S et C126W dans la 2<sup>e</sup> boucle intracellulaire, réduit ou abolit la liaison du fPR avec la protéine G. Il en résulte des infections par *Actinobacillus actinomycetecomitans* qui provoquent une péritonite juvénile localisée. Ceci témoigne du rôle central du fPR dans la lutte contre les infections bactériennes. Le fPR1 est également capable de lier des peptides provenant de l'enveloppe du VIH-1 (Su SB et al, 1999), l'annexin I (Walther A et al, 2000). Les ligands du fPR2 incluent des agonistes de l'hôte tels que LL-37 (De Yang et al, 2000) un peptide de 37 acides aminés issu du clivage naturel de l'extrémité C-terminale de la cathelicidine, une protéine de défense antimicrobienne, lipoxin A4 (Maddox JF et al, 1997) et sérum amyloïde A (Su SB et al, 1999B). Enfin, le fPR3 est capable de se lier à des peptides dérivés d'hélicobacter pilori (Migeotte I et al, 2005). Plus récemment une variété d'antagonistes pour fPR2 a été identifiée. On retrouve le peptide WKYMVm, le QuinC1 ou encore Ck $\beta$ 8-1.

Agoniste / Antagoniste	Provenance	fPR1	fPR2	fPR3
<b>Agoniste bactérien ou viral</b>		<b>EC<sub>50</sub></b>		
fMLP	E.Coli	0,1 - 1 nM	1 µM	-
T20	Peptide VIH-1	0,5 µM	50 µM	-
T21	Peptide VIH-1	0,1 µM	-	-
N36	Peptide VIH-1	-	12,5 µM	-
F peptide	Peptide VIH-1	-	10 µM	-
V3 peptide	Peptide VIH-1	-	2 µM	-
Hp(2-20)	Helicobacter pylori	-	0,3 µM	10 µM
<b>Peptides</b>		<b>EC<sub>50</sub></b>		
WKYMVm	Peptide agoniste	1 nM	1 pM	5 nM
MMK-1	Peptide agoniste	-	0,5 nM	-
WKYMVM	Peptide agoniste	-	2 nM	80 nM
<b>Agonistes endogènes</b>		<b>EC<sub>50</sub></b>		
Ac1-26	Annexine I	5 µM	-	-
Ac9-25	Annexine I	10 µM	-	-
Boc-FLFLF	Peptide synthétique	2 µM	-	-
Peptide se liant au CMH	Sous unité I de la NADH déshydrogénase	-	0,5 nM	-
LL37	hCAP18 (aa1-37)	-	1 µM	-
D2D3	uPAR (aa88-274)	-	5 pM	-
LXA4	métabolite lipidique	-	1 nM	-
SAA	Protéine de la phase aigue	-	0,1 µM	-
Aβ	APP (aa1-42)	-	1 µM	-
PrP106-126	Prion (aa106-126)	-	25 µM	-
<b>Antagonistes</b>		<b>IC<sub>50</sub></b>		
CsH	Champignon	0,5 µM	-	-
DCA	Bile	100 µM	-	-
CDCA	Bile	175 µM	300 µM	-
Spinorphine	Fluide cérébrospinal	6 µM	50 µM	-

**Tableau 4 : Les ligands des fPRs (adapté à partir de Le et al, 2002)**

Parmi les peptides N-formylés susceptibles de se lier au fPR, on retrouve les protéines issues de la mitochondrie. Les mitochondries sont la source de molécules de dangers (DAMPs) relâchées par les cellules après une blessure ou la mort cellulaire. Ces molécules de détresse N-formylées sont capables de se lier sur le fPR et d'activer le système immunitaire (Krysko DV et al, 2011). Les peptides bactériens tels que le fMLP sont 100 à 1000 fois plus efficaces pour activer le fPR1 par rapport au fPR2 (Tableau 4). Par contre, certains peptides N-formylés dérivant de la mitochondrie se lient avec la même efficacité au fPR1 et fPR2 (Rabiet MJ et al, 2005).

### 2.4.3 Expression tissulaire

Le fPR a été initialement détecté dans les neutrophiles et les monocytes. Il a ensuite été ultérieurement observé dans les cellules dendritiques, les cellules microgliales, les plaquettes et la moelle osseuse. Le récepteur est également décrit dans des populations cellulaires non hématopoïétiques telles que les hépatocytes, fibroblastes, astrocytes, neurones. Au niveau tissulaire on retrouve le fPR au niveau du système nerveux central, dans les poumons, la thyroïde, le cœur, artère coronarienne, l'utérus, les ovaires, le placenta, le rein, l'estomac et le colon (Le Y et al, 2002). Alors que les fonctions dans l'immunité sont largement connues concernant le fPR, la fonction des fPR présents dans les cellules non hématopoïétiques reste largement peu connue. Cependant, le fPR

favorise la croissance tumorale des gliomes (Zhou Y et al, 2005) et induit la production d'IL6 dans la lignée d'astrocytes (Le Y et al, 2000).

#### **2.4.4 Régulation de l'expression du fPR**

Les trois gènes qui codent pour les 3 isoformes de fPR sont situés sur le chromosome 19 en position 19q13.3. FPR1 et FPRL1 (fPR2) partagent 69% d'identité d'acides aminés tandis que FPR1 et FPRL2 (fPR3) ne partagent que 56% d'identité d'acides aminés. La demi-vie de l'ARNm du fPR dans les neutrophiles de souris n'est que de 90 min mais peut être considérablement augmentée à plus de 6H après une stimulation par le LPS. Cette stimulation induit également l'expression de l'ARNm de fPR1 (Mandal P et al, 2005).

Les récepteurs fPR sont localisés et actifs au niveau de la membrane plasmique des cellules. On les retrouve également au niveau des endosomes du fait de leur internalisation. Cependant, la situation est différente pour le neutrophile où une majorité des récepteurs est stockée au niveau des granulations intracellulaires. Les travaux précurseurs de Sengelov et collaborateurs (Sengelov H et al, 1994) donnent des informations quant à la localisation dynamique du fPR dans le neutrophile. En absence de stimulation à 4°C entre 20 et 30% de fPR se situe à la membrane plasmique et le reste est stocké au niveau des différentes granules : 40-55% des fPR sont stockés au niveau des granules spécifiques et à gélatinases et 20 à 30% sont stockés au niveau des vésicules sécrétoires. L'incubation des neutrophiles à 37°C entraîne un doublement du taux de fPR à la membrane via l'apport provenant quasi exclusivement des vésicules sécrétoires. Une stimulation des cellules par le PMA et le Paf entraîne la dégranulation des neutrophiles, ceci provoque une relocalisation des récepteurs stockés dans les granules spécifiques ou à gélatinases vers la membrane plasmique.

Cependant, même après cette relocalisation du récepteur à la membrane son expression reste dynamique, elle suit des séquences d'internalisation suite à sa stimulation et de réexpression à la membrane. Ce recyclage du récepteur est étroitement dépendant de la présence des Arrestines sur sa queue C-terminale. En effet, des travaux réalisés dans des lignées MEF déficientes pour l'Arrestine ont montré que la réexpression du récepteur à la membrane était bloquée et qu'il s'accumulait au niveau de compartiments périnucléaires généralement associés à des compartiments de recyclage (Vines CM et al, 2003). Ce résultat indique néanmoins que l'Arrestine ne contrôle pas l'internalisation du fPR après la stimulation des PN.

## 2.4.5 Régulation de l'activité du fPR

De nombreuses études ont montré que les RCPG sont capables de former des dimères avec un même récepteur (homodimère) ou un autre RCPG (hétérodimère) et cette dimérisation contribue à moduler les fonctions cellulaires dépendantes du récepteur (Gomes I et al, 2001). Cette dimérisation est dépendante de l'agoniste, par exemple dans des lignées HEK transfectées l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation permet d'amplifier une réponse anti-inflammatoire. Le ligand LXA4 entraîne l'homodimérisation du fPR2 et augmente la production d'IL10 mais serait aussi capable d'entraîner une hétérodimérisation fPR1/fPR2 augmentant l'activation des voies pro-apoptotiques (Cooray SN et al, 2013).

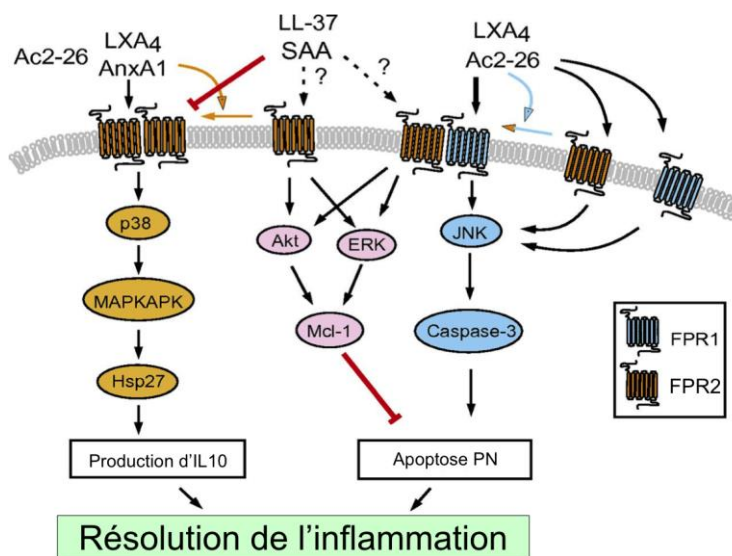


Schéma 10 : Homo et hétérodimérisation de fPR1 et 2 (d'après Janos G, 2013)

Après la stimulation des neutrophiles par le fMLP, les cellules deviennent réfractaires à une nouvelle stimulation par le même agoniste ou certains autres comme l'IL-8 et le C5a. Le récepteur fPR est connu pour être désensibilisé dans les minutes suivant l'exposition avec le fMLP via différents mécanismes. Un mécanisme dit homologue passe par la phosphorylation de la partie C-terminale du récepteur lié à son ligand via des protéines kinases de la famille des GRK. Ces phosphorylations qui font suite à la liaison du récepteur avec son agoniste, induisent l'internalisation du récepteur (Hsu MH et al, 1997) et entraînent également le découplage de la protéine G trimérique du récepteur (Premont RT et al, 1995). En outre, ces phosphorylations permettent également aux Arrestines de se fixer au niveau de la queue C-terminale du récepteur prévenant alors toute liaison ultérieure du récepteur avec une protéine G (Lefkowitz RJ et al, 1998).

Un autre type de désensibilisation du récepteur fPR repose sur des mécanismes hétérologues. Les récepteurs tels que le C5aR ou IL-8R partagent les mêmes voies de transduction que le fPR et

sont en mesure de désensibiliser ce dernier. En, effet l'activation des neutrophiles via l'un de ces récepteurs mobilise le calcium intracellulaire, et entraîne une cross-désensibilisation des récepteurs du fait d'une remobilisation insuffisante du calcium intracellulaire (Richardson RM et al, 1995). Un second mécanisme de désensibilisation hétérologue implique une phosphorylation du récepteur par les PKC. Cependant, ce mécanisme ne serait pas fonctionnel pour le fPR à l'inverse des récepteurs du C5a et IL8 (Richardson RM et al, 1995).

# 3 - Les complexes NADPH oxydase

## 3.1 Historique et description

Les NADPH oxydases sont des complexes enzymatiques producteurs de formes réactives de l'oxygène (FRO) via la consommation d'oxygène moléculaire. L'existence d'une telle consommation d'oxygène par les neutrophiles incubés avec des bactéries était connue de longue date (Baldrige CW and Gerard RW, 1933) mais il a fallu attendre les travaux de Segal et collaborateurs en 1978 (Segal AW et al, 1978) pour découvrir que le composant clé responsable de ce processus était le cytochrome b558 (appelé aussi cytochrome b245). On ne saura que plus tard qu'il interagit avec d'autres composants formant le complexe NADPH oxydase. Par la suite, après la découverte des nouvelles NADPH Oxydases (NOXs) ce complexe a été renommé NOX2 (NADPH Oxydase 2) du nom de son cœur catalytique. En effet, à partir de 1999, d'autres NADPH oxydase ont été identifiées formant la famille des NOX qui à ce jour comporte 5 NOX (NOX1 à 5) et 2 DUOX (DUOX 1 et 2) (Schéma 11).

## 3.2 Les différentes familles de NADPH oxydase

### 3.2.1 Structure et expression

Toutes les NOX sont des protéines transmembranaires qui utilisent des électrons de la NADPH cytosolique via le FAD (flavine adénine dinucléotide) et les transportent via ses hèmes pour réduire l'oxygène soit de manière monovalente pour former l'anion superoxyde (NOX1-5) ou bivalente pour former le peroxyde d'hydrogène (DUOX1/2). Il existe des structures conservées entre toutes les NOX : Dans la partie C-terminale, on retrouve les domaines de liaison du NADPH et du FAD. Elles adoptent toutes une structure avec 6 domaines transmembranaires et enfin on y trouve 4 histidines qui lient l'hème ferrique afin de permettre le transfert d'électron. Enfin, NOX1, 2, 3 et 4 sont associées et stabilisées par la p22phox aux membranes.

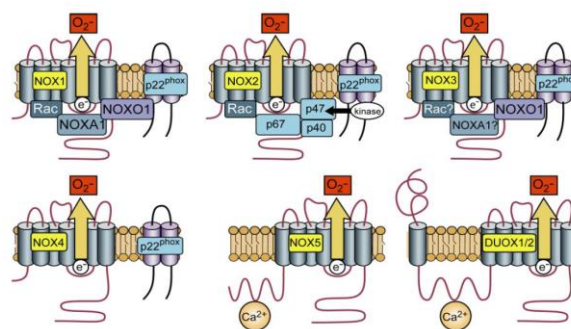


Schéma 11 : La famille des protéines NOX (d'après Bedard et Krause 2007)

Cependant, de profondes différences subsistent également entre ces différentes familles de NOX. La plupart d'entre elles s'associent avec d'autres protéines afin de former un complexe et réguler leur fonctionnement. NOX2 est la première NOX caractérisée et a servi de prototype pour les autres NOX. Son activation est régulée par les protéines cytosoliques,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p40^{phox}$  et Rac2, qui transloquent vers la membrane afin d'activer la NOX2. Les protéines NOX1 et NOX3 nécessitent également des protéines associées : NOXA1 (pour NOX activator 1) et NOXO1 (pour NOX organizer 1) et Rac. A l'inverse, NOX4 n'a pas besoin de partenaires cytosoliques pour être active. Cependant, une activation de NOX4 peut être observée dans des cellules stimulées par le LPS, PMA ou l'insuline. La NOX5 marque une différence avec les autres NOX car elle est pourvue d'une longue portion N-terminale pouvant lier le calcium et ne nécessite ni p22phox ni la présence de partenaires cytosoliques pour être active. L'activation de NOX5 nécessiterait l'augmentation du niveau de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Enfin, les protéines DUOX1/2 marquent de plus profonde différences : elles possèdent contrairement aux autres NOX un domaine peroxydase extracellulaire, et comme NOX5 un domaine intracytosolique liant le calcium de type EF hand ; elles nécessitent la présence de composés DUOXA1 et DUOXA2 pour leur maturation et leur correcte expression (Grasberger H et al, 2006 ; Carré A et al, 2015).

### 3.2.2 Tropisme cellulaire et tissulaire

Malgré des similitudes de structure, il existe de profondes différences de localisation cellulaire et tissulaire entre les différentes familles de NOX (résumées dans le Tableau 5).



Homologue (homologie séquence)	Distribution tissulaire	Localisation cellulaire	Fonction
<b>NOX1</b>  (60%)*	<b>Colon</b> , utérus, C. vasculaires du muscle lisse, prostate, rétine, ostéoclastes	<b>Membrane plasmique, endosomes</b>	<b>Régulation de la pression artérielle</b> , Défense de l'hôte?
<b>NOX2</b>	<b>Cellules myéloïdes, moelle osseuse</b> Lymphocytes B, neuronne, cardiomyocytes, hépatocytes	<b>Membranes intracellulaires (granules), membrane plasmique,</b> région périnucléaire (muscles lisses), mitochondries	<b>Défense immunitaire, signalisation?</b>
<b>NOX3</b>  (56%)*	<i>Oreille interne,</i> <b>tissus fœtaux.</b>	<b>Membrane plasmique</b>	<b>Biosynthèse de l'otoconie</b>
<b>NOX4</b>  (39%)*	<b>Rein</b> , endothélium, ostéoclastes, fibroblastes.	<b>Reticulum endoplasmique membrane plasmique</b> Noyau	Senseur de l'oxygène? vasorégulation ? Signalisation ?
<b>NOX5</b>  (27%)*	<b>Nodules lymphatiques</b> , rate, testicules, rein, utérus.	<b>Réticulum endoplasmique, membrane plasmique</b>	Signalisation ? Capacitation ?
<b>DUOX1/DUOX2</b>  (50%)*	<b>Thyroïde, poumon</b> , glandes salivaires, tractus gastro- intestinal.	<b>Membrane plasmique</b>	<b>Synthèse hormonale</b> , défense immunitaire? Signalisation?

\* Homologie séquence vis à vis de NOX2  
En gras : Localisations et fonctions majoritaires  
(?) : Source de débat

**Tableau 5 : Répartitions et fonctions des NOX (d'après Bedard et Krause, 2007)**

## 3.3 La NADPH Oxydase des neutrophiles : Structure et composants

### 3.3.1 Le cœur catalytique NOX2 / gp91<sup>phox</sup>

La sous-unité gp91<sup>phox</sup> également nommée NOX2 (sous-unité  $\beta$  du cytochrome b<sub>558</sub>) est l'élément essentiel du complexe formant la NADPH oxydase active. Elle est constituée de 570 acides aminés et d'une masse moléculaire de 65.3 kDa. Contrairement à d'autres NOX, elle apparaît avec une taille de 91 kDa sur un gel de SDS-PAGE du fait des glycosylations hétérogènes sur trois de ses résidus asparagine (Asn 132, Asn149 et Asn240) (Wallach TM et Segal AW, 1997). Au repos, 60 à 70% de la NOX2 est localisée dans la membrane des granules spécifiques, 20 à 25% se situe dans la membrane des granules tertiaires et le reste est distribué entre la membrane plasmique et des vésicules

sécrétoires (Borregaard N et al, 1983 ; Kjeldsen L et al, 1994). La partie N-terminale (300 acides aminés) de la protéine prend la forme de 6 boucles transmembranaire disposées en hélices  $\alpha$ . Deux groupements héminique sont localisés entre les transmembranes III et V. La partie C-terminale constitue un domaine cytoplasmique comportant des sites de liaison du FAD et du NADPH.

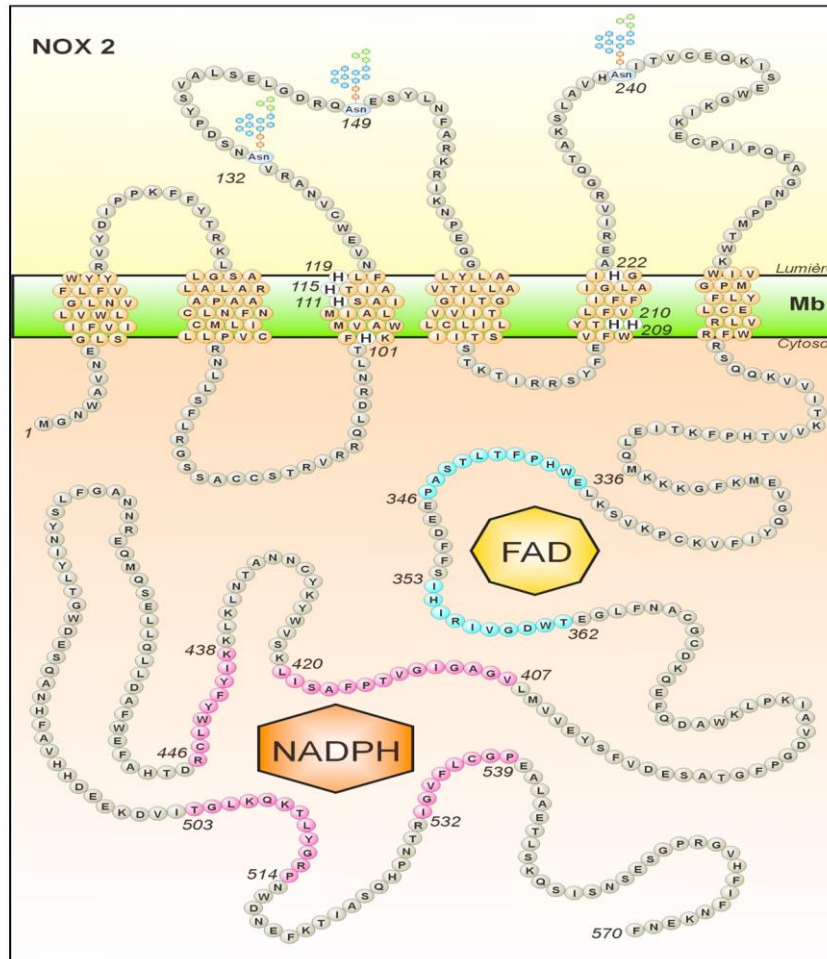


Schéma 12 : Modèle structural de la gp91phox (Bedard et Krause, 2007)

### 3.3.2 La $p22^{phox}$

La  $p22^{phox}$  comprend 195 acides aminés constituant une protéine de 22 kDa. Dans le neutrophile, la  $p22^{phox}$  est associée à NOX2 à la membrane et y forme un complexe équimoléculaire (le cytochrome b558). Néanmoins, contrairement à NOX2 il s'agit d'une protéine ubiquitaire qui est nécessaire à la stabilisation et l'activation de la majorité des autres NOX à l'exception de NOX5 et DUOX1/2. La partie N-terminale de la protéine est composée de deux hélices  $\alpha$  transmembranaires alors que la partie C-terminale cytoplasmique contient un domaine riche en proline appelé PRR (Proline-Rich Region) comportant un motif consensus PxxP (Pro-Xaa-Xaa-Pro). Elle lie la  $p47^{phox}$  lorsque cette dernière est phosphorylée.

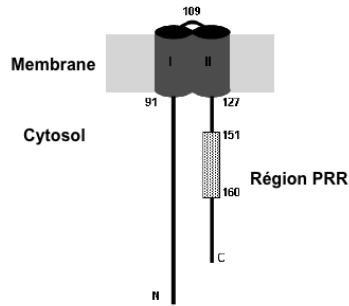


Schéma 13 : Modèle structural de la p22phox

### 3.3.3 La p47<sup>phox</sup>

La sous-unité p47<sup>phox</sup> est une protéine monomérique de 47 kDa constituée de 390 acides aminés se situant principalement dans le cytosol du neutrophile à une concentration de 100-150 ng/10<sup>6</sup> cellules. La p47<sup>phox</sup> comprend de nombreux domaines qui facilitent son attachement aux lipides membranaires et aux autres composants du complexe NADPH oxydase. La partie N-terminale de la protéine comporte un domaine PX (Phox Homology, aa : 4-121) qui lui permet de s'associer aux phospholipides membranaires, deux tandems SH3 (SH3A, aa : 159-214 et SH3B, aa : 229-284) suivis de la région d'auto-inhibition AIR (Autoinhibitory Region, aa : 292-340). La partie C-terminale de la protéine est très basique et est riche en résidus sérines et arginines et comporte le domaine PRR (Proline Rich Region, aa : 363-369) qui permet l'interaction de la p47<sup>phox</sup> avec un domaine SH3 de la p67<sup>phox</sup> dans le cytosol du neutrophile au repos (El-Benna J et al, 2009). La p47<sup>phox</sup> est phosphorylée sur plusieurs résidus sérine situés dans la région AIR durant l'activation de la NADPH oxydase (El-Benna J et al, 1994) et constitue la sous-unité responsable de l'association du complexe cytosolique p40<sup>phox</sup>-p47<sup>phox</sup>-p67<sup>phox</sup> au cytochrome b<sub>558</sub> (gp91<sup>phox</sup>-p22<sup>phox</sup>) au cours de l'activation de la NADPH oxydase. Cependant, il a été proposé qu'elle ne serait pas absolument nécessaire à l'activation de la NOX2 lorsque que la p67<sup>phox</sup> est à forte concentration car *in vitro* la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> est mesurable en absence de p47<sup>phox</sup> (Freeman JL et al, 1996).

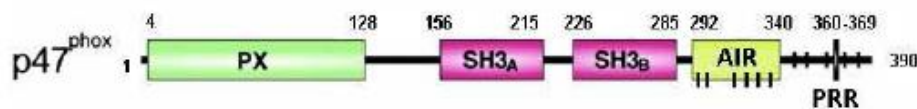


Schéma 14 : Les domaines de la p47<sup>phox</sup> (d'après Groemping Y et Rittinger K, 2005)

### 3.3.4 La p67<sup>phox</sup>

La p67<sup>phox</sup> est une protéine de 526 acides aminés. Les domaines fonctionnels de la p67<sup>phox</sup> consistent en 4 motifs TPR (Tetratricopeptide Repeat), un domaine activateur (AD), un domaine PB1 (Phox-Bem1) et un tandem SH3 en C-terminal (Yang HC et al, 2011). Le recrutement membranaire de la p67<sup>phox</sup> suite à la stimulation des neutrophiles est dépendant de la p47<sup>phox</sup>. L'association p67<sup>phox</sup>-p47<sup>phox</sup> s'effectue via l'interaction entre le domaine PRR de la p47<sup>phox</sup> et SH3 de la p67<sup>phox</sup> ainsi dans le cytosol des neutrophiles au repos elle forme un complexe avec la p47<sup>phox</sup> (Lapouge K et al, 2002). Une fois à la membrane, la p67<sup>phox</sup> s'associe à Rac et le complexe p67<sup>phox</sup>-Rac induit un changement conformationnel de NOX2 permettant le transfert des électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire (Paclet MH et al, 2007 ; Diebold BA et Bokoch GM, 2001).

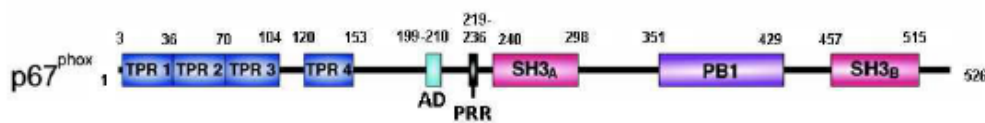


Schéma 15 : Les domaines de la p67<sup>phox</sup> (d'après Groemping Y et Rittinger K, 2005)

### 3.3.5 La p40<sup>phox</sup>

La sous-unité cytosolique p40<sup>phox</sup> est le dernier composant de la NADPH oxydase à avoir été identifié par co-immunoprécipitation avec la p67<sup>phox</sup> et la p47<sup>phox</sup> (Someya A et al., 1993). Il s'agit d'une protéine de 40 kDa et de 339 acides aminés comportant un domaine SH3, un domaine PX et un domaine PB1. Elle interagit avec la p67<sup>phox</sup> via son domaine PB1 alors que son domaine SH3 semblerait interagir mais faiblement avec le domaine PRR de la p47<sup>phox</sup> (Fuchs A et al, 1995). Le domaine PX de la p40<sup>phox</sup> se lie spécifiquement aux phosphoinositides triphosphate membranaires qui s'accumulent dans la membrane phagosome, ce qui pourrait contribuer à faciliter l'assemblage du complexe à cet endroit de la cellule. La découverte récente d'un patient exprimant une p40<sup>phox</sup> mutante a permis d'attribuer à celle-ci un rôle dans la translocation de la p47<sup>phox</sup> et l'activation de la NADPH oxydase (Chessa TA et al, 2010).

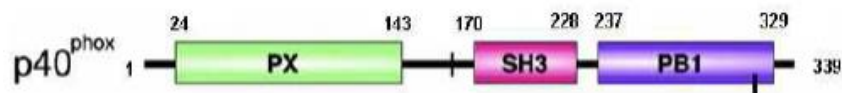


Schéma 16 : Les domaines de la p40<sup>phox</sup> (d'après Groemping Y et Rittinger K, 2005)

### 3.3.6 Rac

Deux isoformes de Rac existent (Rac 1 et 2) dans le neutrophile où ils partagent 92% d'homologie. L'isoforme Rac2 est prédominante dans le neutrophile ; elle est monomérique et possède une masse moléculaire de 21 kDa. La protéine comporte 192 acides aminés et appartient à la sous-famille des Rho GTPases. Ces petites GTPases sont des régulateurs clés d'une large variété de voies de signalisation intracellulaires et régulant le réarrangement du cytosquelette et le chimiotactisme, l'adhésion cellulaire, la phagocytose et la survie cellulaire. Elles sont maintenues inactives lorsqu'elles sont liées au GDP mais sous l'action de GEFs (Guanosine Exchange factors) il y a un échange de ce GDP par le GTP qui permet à Rac d'être sous une forme active. Dans le neutrophile au repos, Rac2 et Rac1 sont retenues dans le cytosol dans un état inactif, liées au GDP et à leur inhibiteur Rho-GDI (GDP Dissociation Inhibitor) qui masque le motif géranygéranyl de la GTPase (Werner E, 2004). Une stimulation appropriée induit la dissociation de Rho-GDI de Rac, le motif géranygéranyl est démasqué et permet l'association de Rac à la membrane d'une manière indépendante du trimère p40-p47-p67<sup>phox</sup> (Groemping Y et Rittinger K, 2005).

## 3.4 L'activation de la NOX2

### 3.4.1 La NADPH oxydase 2 dans les cellules quiescentes

Dans des neutrophiles quiescents la NOX2 est constitutivement associée à la p22<sup>phox</sup>. Cette association est nécessaire puisqu'elle garantit la stabilité de la NOX2 (Parkos CA et al, 1989). Les protéines cytosoliques p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> forment un complexe stœchiométrique et d'une masse moléculaire comprise entre 250 et 300 kDa (Park JW et al, 1994). En effet, ces protéines cytosoliques comportent des domaines d'interaction protéine-protéine tels que les domaines SH3, PX, PC (Schéma 17). Ces domaines confèrent une conformation précise des protéines au repos mais également leur permet de s'associer entre elles. La p47<sup>phox</sup> joue un rôle central dans le processus d'activation du complexe NADPH oxydase du fait de sa capacité à lier à la fois la p22<sup>phox</sup> et le complexe formé de la p67<sup>phox</sup> et p40<sup>phox</sup>. Cependant, dans les cellules non stimulées, elle adopte une conformation repliée sur elle-même : les deux domaines SH3 sont masqués par le domaine d'auto-inhibition AIR tandis que le domaine PX est lui aussi inaccessible. Ceci contribue à réduire l'association des éléments cytosoliques à la membrane plasmique. Ainsi, dans les cellules quiescentes, la NOX2 est maintenue dans une forme inactive au niveau des granules et séparée de ses partenaires cytosoliques maintenus dans le cytosol.

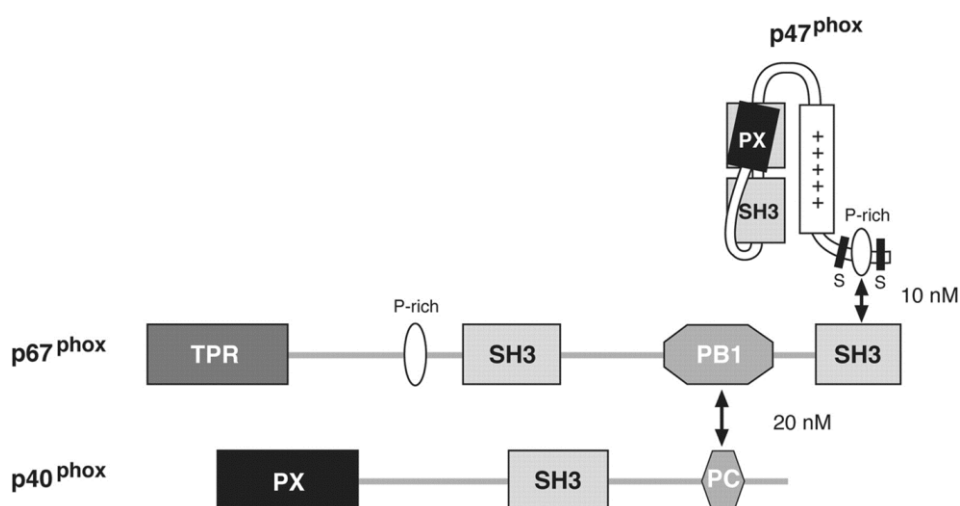


Schéma 17 : Modèle d'interaction entre les composants cytosoliques de la NADPH oxydase (d'après Lapouge K et al, 2002)

### 3.4.2 La phosphorylation des éléments du complexe NADPH oxydase et translocation membranaire des composants cytosoliques

Durant la stimulation du neutrophile les éléments de la NADPH subissent des phosphorylations nécessaires à l'activation de la NOX2.

#### a) p47<sup>phox</sup> :

La p47<sup>phox</sup> est intensément phosphorylée *in vitro* puisqu'on y dénombre 11 sites de phosphorylations sur des sérines au niveau de la région C-terminale : les sérines 303, 304, 310, 315, 320, 328, 345, 348, 359, 370, 379. Ces phosphorylations sont induites par de nombreuses protéine kinases après activation via le fMLP : Les PKC, PAK, ERK1/2, p38-MAPK et AKT. Seule la mutation de la sérine 379 en alanine a complètement inhibé l'activité de la NADPH oxydase (Faust LR et al, 1995). La mutation des sérines 303, 304, 310, 328, 345, 359 ou 370 en alanine n'a que partiellement inhibé l'activité de la NADPH oxydase (Faust LR et al, 1995). Par contre la mutation en alanine de la sérine 348 n'a eu aucun effet. Une grande partie de ces sérines essentielles à l'activation de la NADPH oxydase se retrouvent sur le domaine d'auto-inhibition AIR (compris entre les S303 et S328) où elles sont difficiles d'accès pour les protéines kinases dans les cellules non stimulées.

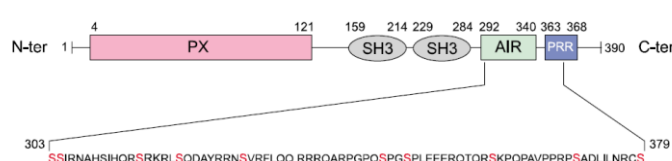


Schéma 18 : Les sites de phosphorylation de la p47<sup>phox</sup> (d'après El-Benna J et al, 2009)

Les différentes phosphorylations de la  $p47^{phox}$  se feraient de manière séquentielle et auraient des fonctions déterminées dans la séquence d'activation de la protéine et du complexe. Ainsi, de récents travaux de l'équipe d'accueil (Dang PM et al, 2006 ; Boussetta T et al, 2010) ont mis en évidence un rôle central de la sérine 345 dans la pré-activation (priming) des neutrophiles par le  $TNF-\alpha$ . Sa phosphorylation permettrait un dépliement partiel de la  $p47^{phox}$  facilitant la phosphorylation des autres sérines. La phosphorylation des sites S303-304 et 328 se trouvant dans le domaine d'auto-inhibition contribuent à l'ouverture de la molécule et l'exposition des domaines SH3 et du domaine PX respectivement impliqués dans les interactions de la  $p47^{phox}$  avec les autres composants de la NADPH oxydase et les lipides membranaires (Ago T et al, 1999). La phosphorylation de la S345 de la  $p47^{phox}$  est également observée dans des PN stimulés par le peptide fMLP en absence de  $TNF\alpha$ , indiquant qu'en plus de son rôle dans le « priming » des PN, elle jouerait aussi un rôle dans l'activation normale de la NOX2 (Rolas L et al, 2013). D'autres sites de la  $p47^{phox}$  sont rapidement phosphorylés dans les cellules stimulées (S304, S315, S320, S328) et contribuent à l'activation de la NOX2 (Belambri SA et al, 2012). L'activation de la NOX2 s'accompagne également de la translocation de la  $p47^{phox}/p67^{phox}$  cytosolique vers la membrane plasmique et son interaction avec la  $p22^{phox}$ .

b)  $p67^{phox}$

Les travaux de Dusi et collaborateurs (Dusi S et al, 1993) ont identifié pour la première fois l'existence de phosphorylations de la  $p67^{phox}$  corrélées à son activation. Le site majeur de phosphorylation ultérieurement identifié se situerait sur la thréonine 223 (Forbes LV et al, 1999), elle se produirait dans le cytosol et précéderait la translocation de la  $p67^{phox}$  à la membrane. L'équipe d'accueil a montré l'existence d'autres sites de la  $p67^{phox}$  phosphorylés chez les neutrophiles quiescents ou stimulés par le fMLP ou PMA (Dang PM et al, 2003). *In vitro*, les MAPK recombinantes ERK2 et p38-MAPK ont été capables de phosphoryler la  $p67^{phox}$  native. ERK2 a principalement phosphorylé la portion N-terminal de la  $p67^{phox}$  alors la portion C-terminale a été principalement phosphorylée par p38-MAPK.

c) La  $p40^{phox}$

L'implication de la  $p40^{phox}$  dans l'activation du complexe NADPH oxydase est toujours discutée mais des travaux de Tsunawaki et collaborateurs (Tsunawaki S et al, 1994) ont pu mettre en évidence qu'elle serait impliquée dans l'activation du complexe. Des travaux basés sur l'utilisation de la lignée HL60 ont pu identifier l'existence d'une phosphorylation basale de la  $p40^{phox}$  et augmentée de manière corrélée à l'activation de la NADH oxydase suite à la stimulation des cellules (Fuchs et al, 1997). De plus récentes découvertes ont permis d'identifier deux sites de phosphorylation sur la  $p40^{phox}$  (Thr-154 et Ser-315) qui seraient dépendants de l'action des PKC

durant la stimulation des neutrophiles. Ces phosphorylations inhiberaient les interactions intramoléculaires entre le domaine PX et PB1 et favoriseraient alors l'interaction de la  $p40^{phox}$  avec le PI(3)P à la membrane plasmique (Ueyama T et al, 2007).

d) La  $gp91^{phox}$

L'équipe d'accueil a pu mettre en évidence l'existence d'une phosphorylation de la  $gp91^{phox}$  dans des neutrophiles stimulés (Raad H et al, 2009). Elle se situerait dans la portion cytoplasmique de la protéine au niveau de la queue C-terminale et serait sensible à l'action des PKC. Trois sites potentiels dans cette portion pourraient être phosphorylés par les PKC : Ser-333, Thr-309 et Ser-550. Les deux premiers sites se situent à proximité du domaine de liaison du FAD tandis que le dernier se situe au niveau du site de liaison du NADPH, ainsi ces phosphorylations pourraient être impliquées dans l'activité diaphorase nécessaire pour la production d'anion superoxyde. Ces travaux ont en outre montré que cette phosphorylation favorise l'interaction de la  $gp91^{phox}$  avec la  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  et Rac-2.

e) La  $p22^{phox}$

De nombreux agonistes ont la capacité d'induire la phosphorylation de la  $p22^{phox}$  : Le fMLP, le zymozan ou encore le PMA. Cela impliquerait la phospholipase D et les PKC (Regier DS et al, 2000). Les résultats *in vitro* montrent en effet que la  $p22^{phox}$  est le substrat potentiel de ces deux kinases : Les PKC ( $\alpha$  et  $\beta$ ) ainsi qu'un substrat de la PLD activé par l'acide phosphatidique « Phosphatidic acid-activated kinase, PAAK ».

### 3.4.3 Les interactions moléculaires entre les partenaires de la NADPH oxydase

Dans les cellules non stimulées les éléments cytosoliques interagissent entre eux, la  $p67^{phox}$  est à la fois associée à la  $p47^{phox}$  et la  $p40^{phox}$  dans une relation stœchiométrique tandis que Rac 2 reste à part. La  $gp91^{phox}$  et la  $p22^{phox}$  se situent dans la membrane des granules. La stimulation des neutrophiles entraîne une série de changements au niveau des protéines du complexe et une translocation des granules vers la membrane plasmique ou phagosome, ce qui les enrichit en cytochrome b558. Les protéines cytosoliques sont phosphorylées et leur conformation 3D se modifie. La  $p47^{phox}$  est considérée comme l'élément permettant le transport des protéines cytosoliques du complexe, durant l'activation elle se déplie et libère ses domaines SH3 et PX. Le domaine SH3 interagit avec la région riche en proline (PRR) de la  $p22^{phox}$ , le domaine PX permet à la  $p47^{phox}$  de s'associer avec les phospholipides membranaires tels que le phosphatidylinositol (Ago T et al, 2003). Ainsi, l'ensemble du complexe cytosolique  $p47^{phox}$ - $p67^{phox}$ - $p22^{phox}$  est transporté vers les éléments membranaires  $gp91^{phox}$ - $p22^{phox}$ . Il est cependant pas clair si cette translocation nécessite la phosphorylation de la  $p47^{phox}$  cytosolique ou se fait via l'interaction du domaine PX ou PH de la



p47<sup>phox</sup> avec les phospholipides générés par la PI3-K (Ago T et al, 2003) et la PLD2 (Stahelin RV et al, 2003).

La p67<sup>phox</sup> et Rac2 jouent un rôle primordial dans l'activation de la gp91<sup>phox</sup>. Les deux protéines transloquent séparément l'une de l'autre mais se retrouvent associées au niveau de la NADPH oxydase active, Rac2 se liant au domaine TRR se situant dans la partie N-terminale de la p67<sup>phox</sup> (Lapouge K et al, 2000). Dang et collaborateurs ont mis en évidence *in vitro* l'existence d'une interaction directe entre p67<sup>phox</sup> et le cytochrome b<sub>558</sub> au niveau de la gp91<sup>phox</sup> et qui serait favorisée par l'interaction entre Rac et p67<sup>phox</sup> (Dang PM et al, 2002). Cependant, le site précis d'interaction entre p67<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup> n'est pas encore identifié. De son côté, lorsque la protéine Rac est libérée de son inhibiteur GDI, elle s'associe avec les phospholipides membranaires (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) où elle se trouve à proximité d'une GEF permettant l'échange du GDP contre le GTP et permet l'activation de Rac2 et sa liaison avec la p67<sup>phox</sup> comme précédemment décrit (revue Pick E et al, 2014). Enfin, outre les interactions entre p40<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> identifiées dans les neutrophiles au repos, le rôle de la p40<sup>phox</sup> dans l'activation du complexe reste à approfondir.

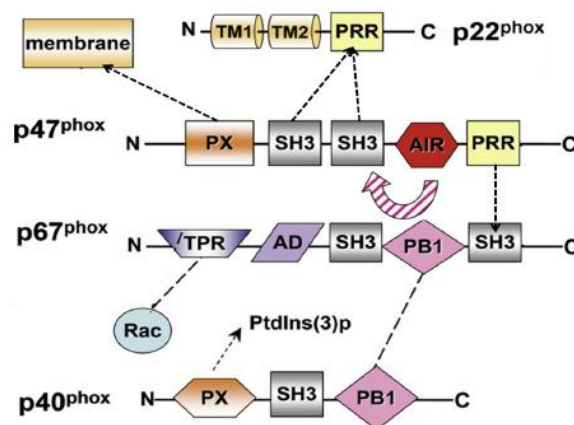


Schéma 19 : Interaction entre les éléments de la NADPH oxydase activée (d'après Krause et al 2007)

Les travaux de Dusi et collaborateurs ont montré que l'inhibition des sérine/thréonine kinases par la staurosporine inhibe la production de FRO des neutrophiles stimulés par le fMLP, les phosphorylations des éléments du complexe associé à la membrane mais n'est pas en mesure d'affecter l'association membranaire de p47<sup>phox</sup>/p67<sup>phox</sup> induite par le fMLP (Dusi S, Biochem J 1993). A l'inverse, la staurosporine a efficacement réduit l'association membranaire de la p47<sup>phox</sup>/p67<sup>phox</sup> induite par le PMA, activateur direct des PKC. L'interaction entre p47<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup> est largement documentée dans des modèles d'activation des PN par le PMA comme nécessaire à l'activation de la NOX2, elle dépend des phosphorylations de la p47<sup>phox</sup> qui va permettre à l'un des domaines SH3 d'interagir avec le domaine PRR riche en proline de la p22<sup>phox</sup> (de Mendez I et al,

1993). Il serait alors possible d'envisager que parmi la  $p47^{phox}$  transloquée à la membrane suite à l'activation des PN par le fMLP, seul le pool phosphorylé participerait à l'accrochage à la  $p22^{phox}$  et à l'activation de la NOX2. Réciproquement, sous fMLP l'association de la  $p47^{phox}$  à la membrane n'impliquerait pas nécessairement une association avec la  $p22^{phox}$ . Ces travaux précurseurs de Dusi et collaborateurs soulèvent donc l'idée d'une translocation de la  $p47^{phox}$  depuis le cytosol qui serait séquentielle avec d'un côté une association à la membrane plasmique et de l'autre côté une association avec la  $p22^{phox}$ . Or, des observations montrent que la présence de la NOX2 est nécessaire pour l'association de la  $p47^{phox}$  et  $p67^{phox}$  à la membrane (Leusen JH et al, 1994). Ceci permet alors d'envisager que cette association de la  $p47^{phox}$  à la membrane plasmique après stimulation par le fMLP ne dépendrait pas uniquement de l'interaction SH3( $p47^{phox}$ ) / PRR( $p22^{phox}$ ) mais qu'elle se réaliserait aussi à un autre endroit du cytochrome b558 et de  $p47^{phox}$  ou sur les phospholipides membranaires. A l'opposé, l'activation directe des PKC par le PMA engendre un niveau plus faible de phospholipides, ainsi la translocation membranaire de  $p47^{phox}/p67^{phox}$  ne se ferait principalement que via les domaines SH3 de la  $p47^{phox}$  vers le PRR de la  $p22^{phox}$ .

#### **3.4.4 L'état actif de la NOX2 et la production d'anion superoxyde**

La  $gp91^{phox}$  est le cœur du complexe NADPH oxydase et responsable de la production d'anion superoxyde. Cette production est finement régulée et nécessite une activation préalable des neutrophiles par des agents solubles ou particuliers comme le facteur du complément C5a, le peptide N-formylé fMLP, le leucotriène B4 (LTB4), le « platelet activating factor » (PAF), les endotoxines bactériennes. Cette activation de la NOX2 est étroitement dépendante de la  $p67^{phox}$  et Rac2 et permet à la NOX2 de transférer d'électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire afin de former l'anion superoxyde. Ce transfert d'électron se ferait en deux étapes. La première étape est nommée l'étape diaphorase, la queue C-terminale cytosolique de la  $gp91^{phox}$  lie le NADPH et transfère l'électron au groupement hémique via le FAD. La deuxième étape consiste au transfert de cet électron depuis l'hème vers l'oxygène moléculaire afin de former l'anion superoxyde (Raad H et al, 2009).

#### **3.4.5 L'inactivation du complexe et l'arrêt de la production d'anion superoxyde**

La production de formes réactives de l'oxygène est une fonction nécessaire pour éliminer l'agent agresseur mais qui peut devenir délétère si elle perdure dans le temps. Plusieurs mécanismes sont donc mis en œuvre afin de mettre un terme à cette production et permettre d'enclencher la réparation tissulaire une fois l'agent pathogène éliminé. Cette désensibilisation fait appel à une internalisation des récepteurs à 7 domaines transmembranaire qui avaient été stimulés, à l'inhibition, par les phosphatases, des phosphorylations des éléments de la NADPH oxydase. La  $p47^{phox}$  en particulier est sensible à ces déphosphorylations. En effet, la PKA et l'AMPc sont capables de réduire les phosphorylations de la  $p47^{phox}$  (Bengis-Garber C et al, 1996).

D'autres mécanismes sont également impliqués dans cette désensibilisation de la NADPH oxydase. Il a par exemple été montré que l'association de la  $p47^{phox}$  et de la  $p67^{phox}$  avec le cytochrome b558 était transitoire. L'arrêt de l'activité de la NADPH oxydase est corrélé avec une diminution de l'association du complexe  $p47^{phox}$ - $p67^{phox}$  à la membrane plasmique (DeLeo FR et al, 1999). Enfin des modifications au niveau de la  $gp91^{phox}$  et  $p22^{phox}$  sont également possibles. Cela pourrait faire intervenir des phosphorylations, mais aussi des dégradations protéolytiques. Ces hypothèses font l'objet de la 2ème partie de notre étude expérimentale.

## **3.5 Les pathologies associées à la dérégulation de l'activité de la NOX2**

Nous avons pu précédemment voir que les NADPH oxydases étaient exprimées dans de nombreux organes. La NOX2 souvent restreinte à son rôle de NOX phagocytaire a également été observée dans d'autres types cellulaires. Cependant cela suggère également que ces cellules qui expriment les NADPH oxydases sont sensibles à la dérégulation de leur fonction. Un excès ou une insuffisance de production de FRO est donc également vecteur de désordres systémiques

### **3.5.1 La granulomatose septique chronique**

Une absence totale ou une expression incorrecte d'un des éléments qui compose le complexe NADPH oxydase 2 conduit à un déficit immunitaires appelé granulomatose septique chronique ou « chronic granulomatous disease » (CGD) se manifestant par la survenue d'infections graves et/ou répétées à différents agents pathogènes principalement bactériens et fongiques. Ce déficit est dû à des mutations au niveau des gènes qui codent pour l'un des éléments du complexe NADPH oxydase. Au cours de cette atteinte génétique, les phagocytes ne produisent pas ou peu de FRO. La forme la plus répandue est liée à la mutation du gène CYBB sur le chromosome X qui code pour la NOX2, et qui concerne environ 2/3 des cas. Outre l'absence d'expression de NOX2, l'expression de la  $p22^{phox}$  est également fortement réduite puisque les deux protéines sont coexprimées dans les cellules (Cross AR et al, 1995). Les autres formes de déficiences sont autosomales récessives et concernent l'atteinte des autres protéines du complexe. Une déficience de la  $p47^{phox}$  est observée dans environ 25% des cas, moins de 5% des cas pour la déficience de  $p67^{phox}$  ou  $p22^{phox}$  et enfin une seule déficience de  $p40^{phox}$  a été décrite jusque là.

Etant donné que la NADPH oxydase 2 est exprimée dans divers autres organes, une atteinte au niveau d'autres fonctions biologiques que la réponse immunitaire est également attendue mais cet aspect reste peu étudié puisque l'urgence médicale se situe dans la nécessité de combattre les infections microbiennes. Néanmoins, les travaux de Hussain et al se sont attachés à évaluer les

atteintes hépatiques qui pourraient toucher les patients CGD déficients pour gp91<sup>phox</sup> et p47<sup>phox</sup>. Ils ont pu mettre en évidence une augmentation transitoire de l'expression d'enzymes hépatiques, le développement d'hépatomégalie et enfin la présence de nodules de régénération est observée (Hussain N et al, 2007). Ainsi, l'étude de ces patients CGD pourrait permettre de comprendre plus finement la contribution de la NADPH oxydase dans la réponse immunitaire mais également dans le fonctionnement biologique d'autres organes.

### 3.5.2 Les atteintes hépatiques

Paramètre important dans notre étude, la surproduction de FRO a un impact direct sur les maladies hépatiques. Plusieurs cellules du foie expriment des NADPH oxydases et entre autre la NOX2, les hépatocytes, les macrophages résidents (cellules de Kupffer) ou encore les cellules étoilées. Les FRO qui y sont produites ont une fonction précise généralement impliquée dans la défense immunitaire, l'apoptose cellulaire et la prolifération des cellules, cependant ces FRO contribuent très largement aux maladies du foie causées par l'abus d'alcool (Arteel GE, 2003). Cette exposition à l'alcool augmente la génération de FRO dans le foie (Kono H et al, 2000) et participe à l'activation des cascades de signalisation qui participent au développement de fibroses hépatiques. Ces FRO ont également une toxicité directe contre les hépatocytes notamment via la production de peroxynitrite et de radical  $\alpha$ -hydroxyethyl (Arteel GE, 2003). Cette partie sera développée d'avantage dans la section 6.

### 3.5.3 Les atteintes pulmonaires

#### a) Généralités

Les FRO générés par la NOX2 des neutrophiles et macrophages jouent un rôle central dans les défenses anti-infectieuses des voies respiratoires. Les deux-tiers des patients CGD incapables de générer une production suffisante de FRO font face à des infections pulmonaires (Salvator H et al, 2015). A l'inverse, une hyperactivation des NOX peut être impliquée dans de nombreuses défaillances pulmonaires : Elles augmentent les dommages pulmonaires dans l'asthme (Ökrös Z et al, 2011), les dommages aigus du poumon retrouvés dans les ALI (acute lung injury) ou ARDS (acute respiratory distress syndrome) en entraînant une diminution de l'altération de la barrière entre l'avéole et le capillaire sanguin via l'endommagement simultané des cellules épithéliales et endothéliales (Carnesecchi S et al, 2012). Enfin les FRO sont également impliqués dans l'hypertension artérielle du poumon (Fresquet F et al, 2006).

#### b) L'emphysème pulmonaire

Le rôle des FRO est ambigu en ce qui concerne les emphysèmes pulmonaires. En effet, des souris déficientes pour la p47<sup>phox</sup> ou la gp91<sup>phox</sup> ont souffert d'une augmentation de l'inflammation

pulmonaires et de la sévérité de l'emphysème pulmonaire causé par l'exposition à la fumée de cigarette (Yao H et al, 2008). En effet, les auteurs ont pu identifier une hausse de l'infiltration des cellules immunitaires, de l'activité MPO, de la sécrétion de mucus et de la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dans les souris déficientes. Les auteurs font l'hypothèse que cette surproduction serait causée par l'accumulation de particules qui ne peuvent être éliminées par les cellules immunitaires.

A l'inverse, d'autres auteurs attestent que la déficience de NOX2 dans des souris les protège de la fumée de cigarette (Lagente V et al, 2008). La déficience en p47<sup>phox</sup> a protégé les souris des effets néfastes de l'élastase, à savoir de l'élargissement des alvéoles pulmonaires et de la dégradation de l'élastine, et cette déficience a entraîné la diminution de l'expression de la MMP9 (Trocme C et al, 2015). En effet, de précédentes études ont pu montrer que les FRO produites par la NADPH oxydase augmentent l'activité de l'élastase circulant dans le sang via l'inhibition de l'inhibiteur endogène l' $\alpha$ 1-antitrypsine. Ceci pourrait constituer un mécanisme par lequel les FRO produits par les neutrophiles circulants amplifient les dommages liés à l'élastase (Hubbard RC et al, 1987). Cette partie sera développée d'avantage dans la section 6.

### **3.5.4 Les atteintes vasculaires**

Le rôle des NADPH oxydases vasculaires dans l'hypertension, les dysfonctionnements endothéliaux, l'athérosclérose, l'hypertension, la resténose a été suggéré (Revue Cai H et al, 2003). L'angiotensine II, qui joue un rôle fondamental dans le maintien de la pression artérielle, a la capacité d'activer la NADPH oxydase des cellules musculaires lisses (Griendling KK et al, 1994). Une activation excessive de la NADPH oxydase par l'angiotensine a été impliquée dans l'augmentation de la tension artérielle chez la souris (Rajagopalan S et al, 1996). L'administration de SOD (superoxyde dismutase) encapsulée dans des liposomes a permis de corriger cette déficience.

### **3.5.5 La polyarthrite rhumatoïde**

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie autoimmune à fréquence élevée (0,5 à 1% de la population adulte). Durant cette maladie, des lésions inflammatoires au niveau des articulations se produisent et sont associées à une augmentation du liquide synovial infiltré massivement par des leucocytes. Les neutrophiles représentent plus de 80% des cellules infiltrantes et ont une activité de la NADPH oxydase qui est augmentée du fait de la présence augmentée de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-8) (El-Benna J et al, 2002). Les FRO jouent un rôle central dans la destruction du cartilage au niveau des articulations en état d'inflammation. Ils contribuent à la dépolymérisation de l'acide hyaluronique, un composant du cartilage, et participent à l'activation de protéases telles que les métalloprotéinases et l'élastase qui sont impliquées dans la dégradation du

collagène (Shabani F et al, 1998). De plus, elles sont capables d'induire des dommages directs à la matrice extracellulaire. L'utilisation de molécules antioxydantes telle que le superoxyde dismutase réduit la sévérité de la pathologie (Kakimoto K et al, 1993).

# 4 - Voies de signalisation du fPR pour l'activation de la NOX2 du neutrophile

## 4.1 La signalisation intracellulaire : Définition

### 4.1.1 Principaux enjeux

La signalisation intracellulaire décrit une partie du système d'information moléculaire qui contrôle l'activité de la cellule et coordonne son action. Elle lui permet de percevoir son environnement et d'y répondre de manière adéquate. Les neutrophiles, comme d'autres types cellulaires, perçoivent la présence d'agents agresseurs ou leurs molécules dérivées ou d'autres types de signaux via des récepteurs en surface ou à l'intérieur de la cellule. La transduction d'un signal se produit alors et enclenche une cascade de réactions biochimiques que la cellule propage et amplifie pour engendrer une réponse cellulaire. Ce signal peut prendre plusieurs formes : influx de calcium depuis le milieu extracellulaire, molécules dérivants de la membrane plasmique telles que le diacylglycérol (DAG), de monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\circ$ ) ou d'un signal redox (superoxyde, peroxyde d'hydrogène etc.). Selon le type cellulaire, la réponse cellulaire stimulée par cette signalisation peut être variée et inclure par exemple des modifications métaboliques, de la forme de la cellule, de l'expression de gènes, entraîne la division, modifie la localisation de protéines etc. Un signal peut causer généralement plusieurs réponses différentes.

Le contact entre le ligand et son récepteur fait office de premier messenger. Cette liaison entraîne généralement un changement de conformation de son récepteur permettant l'activation d'enzymes diverses impliquées dans la propagation du signal et la génération de seconds messagers lipidiques issus de la membrane plasmique ou stockés dans des compartiments. Certains effecteurs diffusent dans le cytoplasme afin de transporter le signal qui aboutira à l'activation des appareils moteurs capables de déclencher des réponses cellulaires fonctionnelles. La transduction du signal met en jeu des activations séquentielles : 1) L'activation d'une protéine par la conversion du GDP la liant en GTP par des GAP (GTPase-activating protein) ou inversement par des GEF (Guanine nucléotide exchange factor) afin d'activer des protéines kinases dont la fonction première est d'ajouter un groupement phosphate à leur cible ; 2) Le passage de protéines d'une forme inactive non phosphorylée vers une forme active phosphorylée par addition d'un groupement phosphate par une kinase (PKC, MAPK etc...).

Des défaillances dans la régulation de la transduction du signal sont responsables de pathologies telles que les cancers, les maladies auto-immunes et des destructions tissulaires. De ce fait, la compréhension des événements qui régissent la signalisation intracellulaire permet de comprendre les mécanismes qui engendrent de nombreuses pathologies.

#### 4.1.2 Les protéines de la transduction du signal issu du fPR

Le récepteur des peptides formylés (fPR) appartient à la classe des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et régule de nombreuses réponses cellulaires dont le chimiotactisme ou encore la production de FRO par le neutrophile. Suite à la liaison du peptide à son récepteur fPR, une large cascade de signalisation va être enclenchée. Cette dernière mobilise de nombreux effecteurs de manière séquentielle formant les voies de signalisation incluant l'activation de phospholipases, qui vont générer des seconds messagers tel que l'acide phosphatidique et qui vont participer à l'activation de protéines kinases (PKC, MAPK, Tyrosines Kinase) et stimuler la fonction cellulaire ciblée. Cette cascade est schématisée dans le Schéma 22 page 71. Certaines voies contribuent plus fortement que d'autres dans les réponses cellulaires. De plus, elles interagissent entre elles formant des boucles d'amplification des signaux pouvant conduire à des réponses excessives et inappropriées.

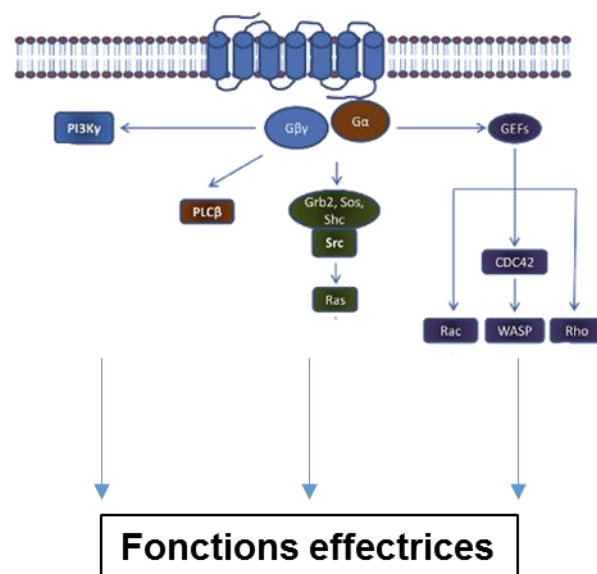


Schéma 20 : La transduction du signal après l'activation du fPR1 (Adapté à partir de Doward DA et al, 2015)



## 4.2 Les protéines G : Déclencheurs de la transduction du signal

### 4.2.1 Les protéines G trimériques

Les protéines G, aussi appelées « Guanine nucleotide-binding proteins » en anglais sont une famille de protéines qui permet le transfert d'information à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires sont généralement couplés à trois hétérodimères de protéines G : les sous unités  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$  qui sont étroitement associées à la face intracellulaire des RCPG. Les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  forment un dimère qui s'associe avec  $G\alpha$  couplé au GDP. La sous unité  $G\alpha$  se subdivise en plusieurs classes majeurs  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{(12/13)}$  et  $G\alpha_{(16)}$  (Simon MI et al, 1991), chacun régulant l'activation de différents effecteurs. La sous-unité  $G\beta$  humaine est composée de 5 classes tandis que la sous unité  $G\gamma$  comprend 12 classes. Ceci permet un grand nombre de combinaison possible qui ont certaines propriétés propres. Par exemple, la paire  $G\beta_1\gamma_1$  interagit de manière plus robuste avec la rhodopsine que les autres combinaisons (Müller S et al, 1991). Dans le neutrophile, le fPR est généralement associé à la sous-unité  $G\alpha_i$ .

Au niveau de leur structure, la sous-unité  $G\alpha$  est composée d'un domaine de liaison nucléotidique qui a une forte homologie structurale avec la superfamille des RAS GTPases et un domaine composé d'hélices alpha. De plus, la sous-unité comporte trois régions flexibles qui changent de conformation en réponse à la liaison avec le GTP (Sondek J et al, 1994). La conformation liée au GTP a une affinité réduite pour le dimère  $G\beta\gamma$ , ce qui entraîne sa dissociation. A l'inverse, la sous-unité  $G\beta\gamma$  ne change pas de conformation lorsqu'elle se dissocie, cependant lorsqu'elle est associée avec  $G\alpha$ , l'hétérodimère  $G\beta\gamma$  ne peut activer ses effecteurs, cela suggère que le site de liaison de  $G\beta\gamma$  avec ses substrats est partagé avec le site de liaison de  $G\alpha$  (Li Y et al, 1998).

### 4.2.2 L'activation des protéines G trimériques

L'activation des protéines G est séquentielle comme le décrit le Schéma 21. Lorsqu'un ligand se lie aux RCPG, il induit un changement de conformation du récepteur ce qui permet à la sous-unité  $G\alpha$  de lier le GTP en lieu et place du GDP. Cet échange enclenche la dissociation de la sous-unité  $G\alpha$  initialement attachée à  $G\beta\gamma$  mais également une « dissociation » du récepteur entier, ainsi  $G\alpha$ -GTP et  $G\beta\gamma$  peuvent activer leur cascade de signalisation qui seront ultérieurement décrites.

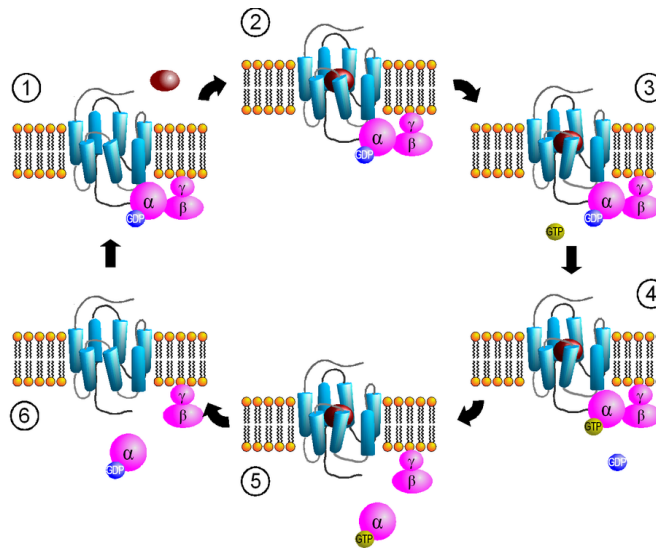


Schéma 21 : Activation des RCPG (Jähnichen S, Wikipedia)

Afin de revenir dans son état initial, la sous-unité  $G\alpha$  a la capacité d'hydrolyser son GTP en GDP via son activité enzymatique propre, ce qui permet sa réassociation à  $G\beta\gamma$ . D'autres protéines ont également la capacité d'accélérer ce retour à l'état initial : La famille des RGS (protéines qui régulent la signalisation dépendante des protéines G) accélère l'activité GTPase de la protéine G. Enfin, des effecteurs de  $G\beta\gamma$  telle que la  $PLC\beta$  développent également la capacité d'induire l'hydrolyse du GTP en GDP (Sprang SR et al, 2007 ; Bernstein G et al, 1992).

### 4.2.3 Les petites protéines G

La superfamille des petites protéines G sont nommées ainsi car elles sont analogues à la sous-unité alpha de la protéine G mais elles se trouvent dans le cytosol. Les petites protéines G se lient également aux nucléotides guanyliques, possèdent une activité GTPase intrinsèque et le changement entre GTP et GDP affecte très fortement leur affinité pour leurs cibles. Ci-dessous figure un tableau regroupant les petites protéines G les plus connues et leurs fonctions possibles.

Nom	Fonction cellulaire proposée
Ras	Contrôle l'activation des MAPK
Rac, CDC42	Contrôle du cytosquelette
Rab	Contrôle le mouvement des vésicules et l'exocytose
Rho	Assemblage du cytosquelette
ARF	Assemblage et fonctionnement de l'appareil de Golgi
EFTU	Associé au ribosome où il régule la synthèse protéique
Ran	Mouvement des ARN et protéines

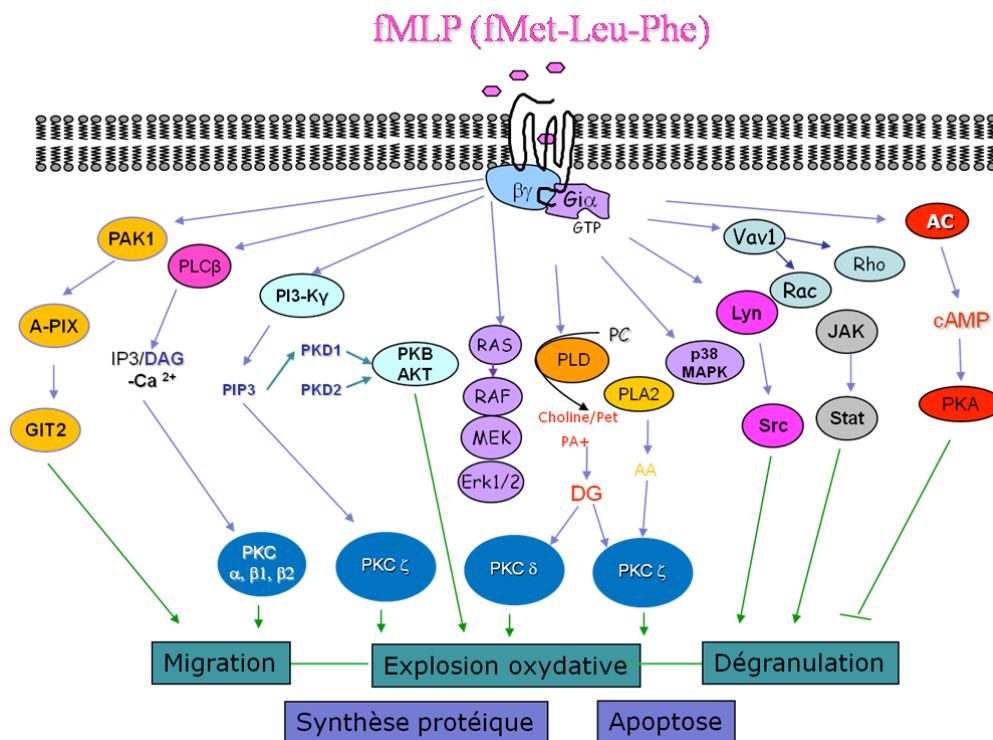
**Tableau 6 : Exemple de protéines G (Adapté d'après Nestler EJ et al, 1999)**

La famille RAS est la mieux caractérisée des petites protéines G. Elle a été identifiée pour sa capacité à contrôler l'activation des MAPK. Ce mécanisme sera abordé dans la section traitant des MAPK. Son activité est dépendante de l'activation de la sous unité  $G\beta\gamma$  et se fait via l'activation de GEF. A titre d'exemple, SOS se lie à Ras et provoque la libération du GDP, étant donné que le GTP est dix fois plus abondant que le GDP dans le cytosol le GTP a plus de chance de se fixer sur Ras libre. Cette liaison avec le GTP induit des changements conformationnels dans Ras qui sont responsables de son activation. (Ahearn IM et al, 2011). A l'opposé des GEF, les GAP se lient à Ras et activent son activité GTPasique intrinsèque afin de convertir le GTP en GDP et ainsi réduire l'activation de Ras.

#### **4.2.4 Les voies de signalisation en aval des protéines G**

Les protéines G sont généralement considérées comme le point de départ de la transduction du signal consécutif à l'activation du fPR. Chacune des quatre classes de sous-unité  $G\alpha$  possède donc des cibles cellulaires bien établies. L'adénylyl cyclase fut le premier élément découvert en aval des protéines G (Hurley JH et al, 1999). Elle est activée par la sous-unité  $G\alpha_s$  et lui a conféré son nom « s » pour stimulatrice. A l'inverse, la sous-classe  $G\alpha_i$  qui est associée au fPR a été identifiée pour sa capacité à inhiber l'adénylyl cyclase (Hurley JH et al, 1999). Concernant la sous-unité  $G\beta\gamma$ , elle n'a été initialement décrite que pour sa capacité à inhiber  $G\alpha$ . Cependant, il est désormais connu que suite à sa dissociation avec  $G\alpha$ , la sous-unité  $G\beta\gamma$  libre est également capable d'activer de nombreux effecteurs.

Les voies de signalisation des récepteurs chimiotactiques et en particulier du fPR sont complexes et sont résumées dans le Schéma 22. Après activation du fPR et de la protéine G trimérique, le dimère  $\beta\gamma$  active la phospholipase  $C\beta_2$  (PLC $\beta_2$ ) et la phosphoinositol 3 kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) qui convergent tous deux vers l'activation des protéine kinases C (PKC). La PI3K $\gamma$  entraîne également l'activation de la protéine kinase B (PKB / AKT). Parallèlement, G $\beta\gamma$  active des protéines GEF (Guanine nucleotide exchange factors) telles que Vav1 et qui stimulent la libération du GDP des petites protéines G et leur interaction avec le GTP. Ceci permet l'activation des petites protéines G Ras, Rho et Cdc42.



### 4.3 Les phospholipases

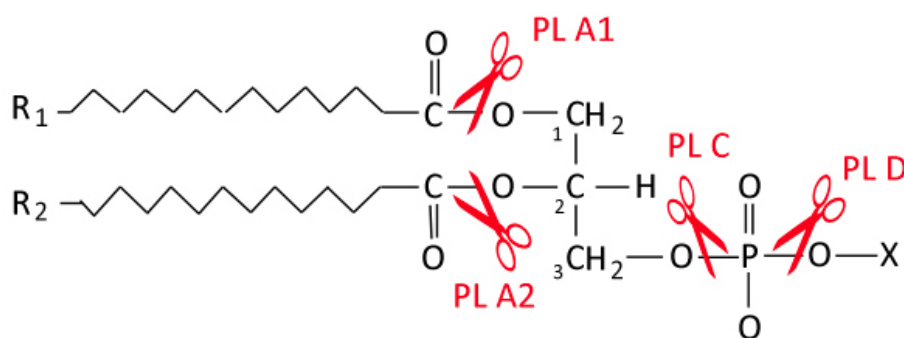


Schéma 23: Clivages des phospholipides par les phospholipases (Wikipedia)

Ce sont les PLA2, les PLC et PLD qui jouent un rôle majeur dans l'activation du neutrophile stimulé par le fMLP.

#### 4.3.1 La phospholipase A2 (PLA2)

La phospholipase A2 (PLA2) catalyse la réaction d'hydrolyse des phospholipides au niveau de la position sn-2-acyl pour induire la libération des acides gras cis-insaturés, préférentiellement l'acide arachidonique (AA), ainsi que les lysophospholipides. Cette activité de la PLA2 est indépendante du calcium (Baggiolini M et al, 1993). Des agonistes tels que le fMLP et les facteurs de croissance sont capables d'activer la PLA2 via leur récepteurs couplés à la protéine G. L'acide arachidonique généré a la capacité d'activer la famille des PKC $\zeta$  sous l'action de la PLA2 et est donc impliqué dans l'activation des fonctions du PN stimulé par le fMLP à des concentrations physiologiques. Il participe ainsi à l'activation de la NADPH oxydase, la dégranulation des neutrophiles ainsi que l'expression du récepteur type 3 du complément (CR3) (Baggiolini M et al, 1993). L'acide arachidonique sert également de précurseur pour de nombreux médiateurs inflammatoires regroupés sous le terme d'eicosanoides (prostaglandines, thromboxane, leucotriènes). Ces derniers jouent d'importants rôles aussi bien physiologiques que pathophysiologiques (Tithof et al., 1998).

#### 4.3.2 La phospholipase C (PLC)

Il s'agit d'un groupe de lipases qui comprend quatre membres : PLC $\alpha$ , PLC $\beta$ , PLC $\gamma$  et PLC $\delta$  ; ces différentes PLC sont constituées d'une seule chaîne de polypeptides. Toutes les quatre formes de la PLC ont des propriétés catalytiques similaires, elles catalysent l'hydrolyse de trois phosphoinositides communs de manière dépendant au calcium : le phosphatidyl inositol, le phosphatidyl inositol 4-phosphate et le phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate. Cependant, le potentiel de dépendance au Ca<sup>2+</sup> diffère suivant l'isoforme de la PLC (Dennis EA et al, 1991). La PLC $\beta$  est l'isoforme principale impliquée dans la signalisation en aval du fPR. Elle permet la génération du DAG et de l'IP3 (Bokoch GM, 1995) qui ont une contribution majeure dans l'activation des fonctions biologiques des PN stimulés par le fMLP. L'IP3 étant hydrosoluble diffuse à travers le cytosol où il

se fixe sur les canaux calciques au niveau du réticulum endoplasmique et induit la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire active de nombreuses enzymes calcium dépendantes, en parallèle de l'action de DAG (Bokoch GM, 1995).

### 4.3.3 La phospholipase D (PLD)

Il s'agit d'une phosphodiesterase qui catalyse préférentiellement l'hydrolyse de la phosphocholine (PC) sur la liaison phosphodiester distale générant ainsi l'acide phosphatidique (AP) et la choline. La PLD possède également une deuxième propriété catalytique : La transphosphatidylation qui se produit en présence d'alcools primaires à courte chaîne tels que l'éthanol. Dans ce cas l'alcool primaire sert d'accepteur pour le groupement phosphatidyl, au détriment de l'eau. Cette réaction conduit à la formation du phosphatidylalcool correspondant en principe à une molécule biologiquement inactive.

Au sein du neutrophile, l'activation de la PLD peut être induite par le fMLP via l'activation de la protéine G et requiert la présence du calcium. L'acide phosphatidique issu de l'activité de la PLD est déphosphorylé par une PA-phosphatase pour former le DAG, qui peut activer à son tour la PKC (Dennis EA et al, 1991) ou la protéine kinase mTOR (Foster DA, 2009). Les PLD possèdent dans leur domaine N-terminal un domaine conservé ressemblant fortement au domaine consensus phox (PX) (Ponting CP et Kerr ID, 1996). Les domaines PX sont impliqués dans une grande variété d'interaction protéine-protéine incluant la liaison à des kinases ou à des domaines de type SH3. De ce fait, la PLD est impliquée dans de grandes variétés de fonctions des neutrophiles telles que la migration, la phagocytose, la dégranulation ou encore la production de FRO. L'AP et le DAG ont été capables de stimuler de manière synergique les composants du complexe NADPH oxydase dans un système acellulaire (Palicz A et al, 2001) et l'ajout de manière exogène d'AP stimule l'explosion oxydative sans ajout de calcium (Perry DK et al, 1993). En outre, l'AP a également la capacité de favoriser le recrutement à la membrane des éléments cytosoliques du complexe NADPH oxydase. Il a en effet été montré que l'AP provoquait la translocation membranaire de la  $\text{p47}^{\text{phox}}$  (Karathanassis D et al, 2002). Dans le neutrophile stimulé par le fMLP, c'est l'isoforme PLD2 associé à la membrane plasmique qui produit presque la totalité de l'acide phosphatidique et régule la NOX2 (Paruch S et al, 2006). De plus, elle est aussi directement activée par ERK1/2 (Paruch S et al, 2007), elle-même activée via AKT1/2 (Patel et al, 2010). De ce fait, la PLD est impliquée dans des fonctions clés du neutrophile notamment la production de FRO par la NADPH oxydase.

## 4.4 La voie PI3K / AKT

### 4.4.1 La PI3K

La phosphoinositide 3-kinases (PI3K) regroupe une famille d'enzymes impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que la croissance, la prolifération, la différenciation, la survie, la mortalité ou encore les mouvements intracellulaires. Cette famille est divisée en 4 classes (Class I, II, III, IV) suivant leur structure primaire, leur régulation et leur substrat (Leevers SJ et al, 1999). La PI3K de classe I joue un rôle central dans la modulation des réponses de l'immunité innée et adaptative. Elle est active au sein d'un complexe composé d'une partie catalytique, la sous-unité p110 divisée en 4 sous classes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , et associé à une portion régulatrice divisée en 5 variant (p50 $\alpha$ , p55 $\alpha/\beta$ , p85 $\beta$  ou p101 $\gamma$ ). La PI3K est principalement localisée dans le cytosol des cellules non stimulées, l'activation des RCPG entraîne son recrutement au niveau des fractions membranaires (Naccache PH et al, 2000). Dans le neutrophile, le fPR active indirectement la PI3K $\gamma$  (p110 $\gamma$ -p101 $\gamma$ ) au travers d'une interaction directe avec G $\beta\gamma$ , néanmoins peu de choses sont connues concernant le mécanisme précis de cette activation. Une fois activée, la PI3K $\gamma$  réagit avec les phospholipides membranaires et catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PtdInsP2 ou PIP2) afin de former le phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3 ou PIP3) et qui ensuite régule une grande variété de fonctions biologiques et notamment l'activation de certaines PKC. En outre, le PIP3 a la capacité de recruter à la membrane les protéines comportant un domaine Pleckstrin Homology (PH) telles que AKT ou encore les tyrosines kinases.

### 4.4.2 AKT

La protéine AKT également nommée Protéine Kinase B (PKB), est une protéine de 60 kDa homologue cellulaire de l'oncogène viral v-AKT. Il s'agit d'une sérine/thréonine protéine kinase de la famille des AGC kinases et qui joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions biologiques comme dans la survie et la prolifération cellulaire (Revue Vivanco I et Sawyer CL, 2002). AKT constitue une famille de sérine/thréonine kinase contenant un domaine PH et un domaine catalytique. Il existe 3 isoformes d'AKT: AKT1 (PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB $\beta$ ) et AKT3 (PKB $\gamma$ ).

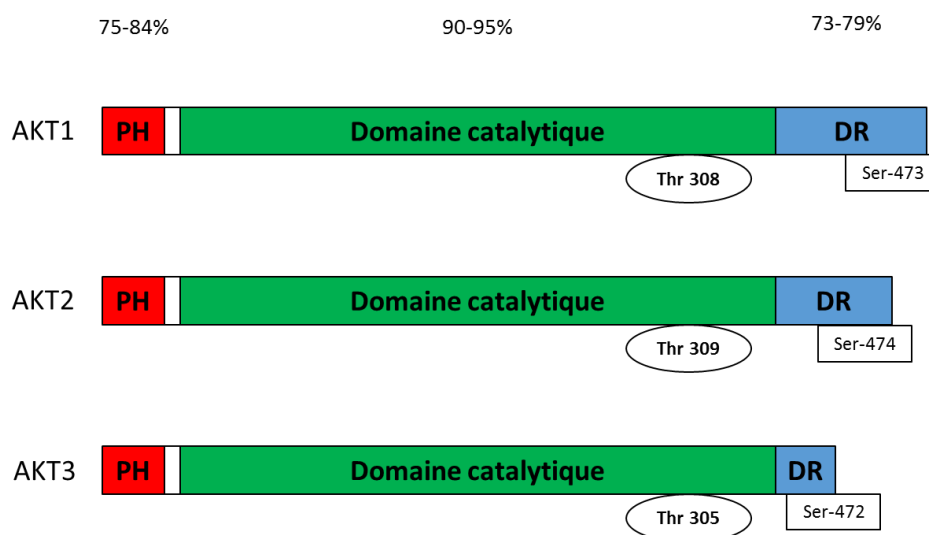


Schéma 24 : La famille des protéine kinases B

Les différentes isoformes d'AKT partagent une grande homologie de structure particulièrement au niveau du domaine kinase. Malgré cela, ces isoformes ont une répartition inégale dans l'organisme : AKT1 se retrouve dans la plupart des cellules eucaryotes où elle joue un rôle dans la synthèse protéique, le développement et la survie cellulaire en empêchant les processus d'apoptose, AKT2 est principalement distribuée dans les organes répondant à l'insuline et enfin AKT3 est exprimée dans la plupart des cellules de l'adulte à un plus bas niveau que les deux autres isoformes à l'exception du cerveau et des testicules où elle est très abondante.

Dans le neutrophile humain, on retrouve les 3 isoformes d'AKT (Patel et al, 2010). AKT1 et 2 interviennent dans le chimiotactisme, la dégranulation et la production d' $O_2^-$  (Hannigan MO et al, 2004, Patel et Coll 2010). AKT possède un domaine Pleckstrin Homology (PH) qui lui permet de transloquer à la membrane plasmique pour se lier aux phospholipides comme le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. La translocation membranaire d'AKT peut donc être induite par le fMLP (Patel S et al, 2010) et est important pour l'activation de la kinase puisqu'elle lui permet de se situer à proximité de la kinase PDK1 qui la phosphoryle sur la Thr-308. Une autre phosphorylation sur la Ser-473 est nécessaire ; elle est réalisée par PDK2 et mTORC2. Le contrôle de l'activation d'AKT par mTOR sera revu en détail dans le chapitre 5 traitant de mTOR.

AKT phosphoryle de nombreuses protéines probablement via la reconnaissance d'un site minimal consensus de la forme R-X-R-X-X-S/T-B (B représente des résidus hydrophobiques et R assurant la spécificité du substrat pour AKT par rapport à d'autres AGC kinases comme RSK et S6K1) (Alessi DR et al, 1996). Au niveau des neutrophiles, l'implication d'AKT dans l'activation de la NADPH oxydase a été suggérée *in vitro*. La kinase phosphoryle les sérines 304 et 328 de la  $p47^{phox}$



(Hoyal CR et al, 2003 ; Chen Q et al, 2003). L'équipe d'accueil a ainsi pu montrer à l'aide de lignées HL60 différenciées en neutrophile qu'AKT1 contribuait majoritairement à la génération d'anion superoxyde induite par le fMLP alors que la contribution d'AKT2 était plus réduite. En outre, ces travaux ont révélé qu'AKT contrôlait l'activité de la phospholipase D de manière dépendante de p44/42 MAPK (Patel S et al, 2010). Néanmoins, des travaux réalisés dans des neutrophiles de modèles murins, où AKT1 ou AKT2 ont été inactivés, ont, à l'inverse, mis en évidence qu'AKT2 jouait un rôle plus important qu'AKT1 dans la production d'anion superoxyde, la libération des granules et la migration cellulaire (Chen J et al, 2010). Au niveau de la NADPH oxydase, les auteurs ont pu évaluer qu'AKT2 contrôlait également la phosphorylation et la translocation membranaire de la  $p47^{phox}$  (Chen J et al, 2010). Ainsi, les voies régulées par AKT sont au cœur de nombreuses fonctions du neutrophile.

Dans des lignées cellulaires, AKT induit l'activation du complexe mTORC1 selon deux mécanismes. Le premier implique une levée de l'inhibition de mTORC1 via l'inactivation de l'hétérodimère TSC1/TSC2 (Inoki K et al, 2002) et l'induction de la dégradation du répresseur PRAS40 (Wiza C et al, 2012). Récemment, il a été montré qu'AKT pouvait promouvoir la phosphorylation de mTORC1 par l'intermédiaire d'IKK $\alpha$  dans des lignées cancéreuses (Dan HC et al, 2014). Etant donné que mTORC1 est impliquée dans la migration du neutrophile induite par le GM-CSF et l'IL8 (Gomez-Cambronero et al, 2003), cela pourrait permettre d'apporter un nouveau regard sur la manière dont AKT contrôle également la migration des neutrophiles. Et inversement, étant donné qu'AKT contribue fortement aux fonctions de défenses anti-bactériennes du neutrophile, cette relation PI3K/AKT/mTOR pourrait suggérer que mTORC1 y contribuerait également. Des éléments de réponse sont apportés dans l'étude présentée au sein de ce manuscrit.

## 4.5 Les MAP-Kinases

Les Mitogen-activated protein kinases (MAPK) sont une famille de protéines kinase qui phosphorylent spécifiquement des sérines, thréonines et tyrosines. Elles sont généralement impliquées dans la réponse cellulaire suite à divers stimuli comme des stimuli mitogéniques, un stress osmotique, la chaleur et des agents pro-inflammatoires. Ainsi, elles contrôlent diverses fonctions cellulaires comme l'expression de gènes, la différenciation, la mitose, la survie cellulaire ou encore l'apoptose. Il existe quatre grandes classes de MAPK : p44/42 MAPK (ERK1/2), p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  MAPK, c-Jun N-terminal kinases (JNK1/2/3) et ERK5.

A leur état basal, les MAPK sont inactives et requièrent des phosphorylations pour être pleinement activées. Ceci est réalisé par des enzymes spécialisées comme résumé dans le Schéma 25 ci-dessous/

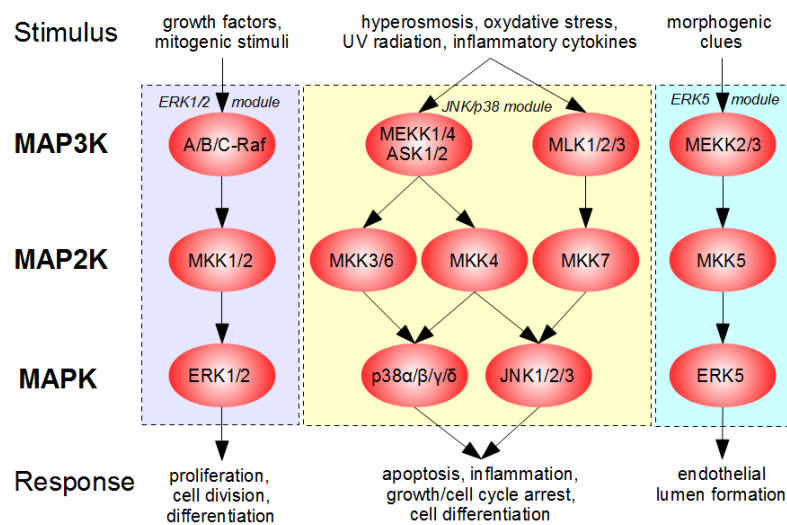


Schéma 25: MAPK-pathway-mammalian (Wikipedia)

Les phosphorylations activatrices des MAPK sont réalisées par d'autres kinases spécialisées nommées MAP2 kinases (également nommées MAP-kinase-kinase). Elles-mêmes nécessitent d'être phosphorylées et activées par des MAP3 kinases. Etant donné que ces différents activateurs n'ont pas d'autres fonctions connues que d'induire l'activation des MAPK, on parle donc d'un module MAPK.

L'activation des MAPK via le récepteur fPR dépend à la fois du dimère  $G\beta\gamma$  et de  $\alpha$ , et mobilise les 3 premières familles, ERK1/2, p38-MAPK et JUNK. Par ailleurs, le traitement des neutrophiles par le G-CSF, GM-CSF et TNF entraîne une activation des MAPK de manière différentielle. G-CSF entraîne uniquement l'activation du module ERK1/2, le GM-CSF entraîne une forte activation du module ERK1/2 et une faible activation du module p38-MAPK et enfin le  $TNF\alpha$  produit l'effet inverse en activant fortement le module p38-MAPK et faiblement le module ERK (Suzuki K et al, 1999).

#### 4.5.1 p38-MAPK

La p38-MAPK partage 50% d'identité au niveau des acides aminés avec ERK1/2 et se divise en quatre groupes : p38- $\alpha$  (MAPK14),  $\beta$  (MAPK11),  $\gamma$  (MAPK12 ou ERK6) et  $\delta$  (MAPK13 / SAPK4). La p38-MAPK est activée dans un module complexe qui comprend différentes MAP3K et MAP2K comme résumé dans le Schéma 25 ci-dessus. Dans les détails, MKK6 active toutes les isoformes de p38-MAPK alors que MKK3 active préférentiellement p38 $\alpha$  et  $\beta$ , MKK4 peut à la fois activer les JNK et p38 (Enslen H et al, 2000). Dans les cellules de mammifères, les différents

isoformes de la p38-MAPK sont fortement activées après un stress environnemental et dans des conditions inflammatoires au contraire des stimuli mitogéniques. Cependant, les protéines impliquées dans l'activation du module ne sont pas encore clairement déterminées.

La p38-MAPK est retrouvée dans le noyau et le cytoplasme de la plupart des cellules quiescentes mais sa localisation après stimulation reste à déterminer. Certains travaux précurseurs réalisés dans des lignées COS montrent une répartition cellulaire et nucléaire de la p38-MAPK (Raingeaud J et al, 1995). Dans les neutrophiles, l'activation de p38-MAPK est impliquée dans l'explosion oxydative, le chimiotactisme, la dégranulation, l'adhérence, et l'apoptose (Kim D et al, 2013 ; Mocsai A et al, 2000 ; Aoshiba K et al, 1999). Les mécanismes par lesquels p38-MAPK contrôle ces fonctions émergent : Au niveau de la NADPH oxydase, p38-MAPK est capable de phosphoryler la p47<sup>phox</sup> au niveau de la Ser-345 (Dang PM et al, 2006) mais aussi la p67<sup>phox</sup> (Dang PM et al, 2003). De plus, la p38-MAPK serait également capable de phosphoryler la phospholipase A2, la protéine Tau et différents facteurs de transcription (Kyriakis JM et al, 2001).

#### **4.5.2 p44/42-MAPK ou ERK1/2**

La p44/42-MAPK également nommée ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases1/2*) comprend deux entités fortement semblables (ERK1 et ERK2) qui partagent 83% d'identité d'acides aminés. Suite à la stimulation du neutrophile par le fMLP, la petite protéine G Ras est recrutée à la membrane et activée via la conversion du GDP en GTP. Elle interagit alors avec une large variété d'effecteurs en aval y compris avec le module ERK1/2. Dans les détails, Ras active A/B/C-Raf (Geyer M et al, 1997) probablement par de multiples phosphorylations. Une fois activée, Raf s'associe et phosphoryle MEK1 et 2 qui en retour phosphorylent ERK1/2 au niveau du site conservé Thr-Glu-Tyr. La forme ainsi activée de ERK1/2 phosphoryle de nombreux substrats dans différents compartiments cellulaires, incluant des protéines membranaires ou nucléaires. D'une manière générale, l'activation de la voie ERK via les RCPG implique une dizaine de voies de signalisation (Gutkind JS et al, 2000).

La contribution de ERK1/2 dans la génération d'anion superoxyde par les PN stimulés par le fMLP est toujours discutée. En effet, l'inhibition des MEK1/2 par l'inhibiteur PD98059 ne réduit pas la production d'anion superoxyde des PN stimulés par le fMLP (Kuroki M et al, 1997). En revanche, l'antagoniste de ERK1/2, U0126, inhibe partiellement cette l'explosion oxydative des PN (Djerdjouri B et al, 1999 ; Paruch S et al, 2006), indiquant que ERK1/2 intervient mais n'est pas indispensable pour l'activation de la NOX2. De plus, le traitement des PN par le G-CSF, activateur de ERK1/2 mais pas des autres MAPK, n'est pas en mesure d'induire la génération d'anion superoxyde (Yuo A

et al, 1989). Cependant, l'inhibition de ERK1/2 inhibe la phosphorylation de p47<sup>phox</sup> induite par le fMLP (Dewas C et al, 2000).

### 4.5.3 Les Jun kinases

Les JNK se composent de 3 sous-classes : JNK1, JNK2 et JNK3, elles sont fortement activées en présence de cytokines, d'irradiation aux UV, de la réduction de la concentration des facteurs de croissance et certaines protéines G. L'activation de JNK s'inscrit dans un module très proche de celui de p38-MAPK dans lequel les mêmes MAP3K interviennent, à savoir ASK, MEKK, MLK, TAK1 et TPL-2. Néanmoins, alors que l'activation directe de p38-MAPK passe par MKK3/6 et potentiellement MKK4, l'activation de JNK requiert uniquement MKK7 et MKK4.

Des controverses subsistent concernant la contribution des JNK dans les fonctions des neutrophiles. L'équipe d'accueil a en effet rapporté que contrairement à ERK1/2 et p38-MAPK, les JNK ne contribuaient pas à la phosphorylation de p47<sup>phox</sup> (El Benna J et al, 1996). Cependant, c-JNK est bien activée dans les PN stimulés par le TNF $\alpha$  (Kato T et al, 2008) qui par ailleurs est un faible stimulant de la NOX2 des PN. Dans les cellules HL-60 différenciées, le fMLP stimule bien JNK ainsi que les deux autres MAPK mais la contribution de JNK dans l'explosion oxydative n'avait pas été étudiée faute d'antagoniste (Rane MJ et al, 1997).

## 4.6 Les tyrosine kinases

Les tyrosines kinases phosphorylent leurs cibles protéiques au niveau d'un site tyrosine. Tout comme les sérines/thréonines kinases, elles participent à la transduction du signal suite à l'activation de nombreux types de récepteurs. On distingue deux grandes familles de tyrosines kinases : les protéines associées à la membrane plasmique (RTK ou Receptor Tyrosine Kinase) subdivisées en 17 sous-classes et des protéines cytosoliques non-récepteurs représentée par une trentaine de membres dans les cellules eucaryotes. Ce sont ces dernières qui seront décrites.

Les neutrophiles n'expriment que 3 membres de la famille des Src tyrosine kinase : Hck, Fgr et Lyn. La délétion de ces trois composants empêche la libération des granules et la production d'anion superoxyde induite par le fMLP (Mócsai A et al, 1999 ; Fumagalli L et al, 2007) et la déficience de la famille des Src tyrosine kinase réduit l'activation des JNK et p38-MAPK induite par le fMLP (Mócsai A et al, 2000 ; Fumagalli L et al, 2007). Cependant, leur rôle dans la migration des neutrophiles est controversé. En effet les neutrophiles de souris déficientes pour Hck, Fgr ou Lyn ont été incapables de migrer au travers d'un système transwell en présence de 2  $\mu$ M de fMLP (Mócsai A et al, 2002) alors que les neutrophiles humains n'ont pas été affectés par les inhibiteurs des

tyrosines kinases (Futosi K et al, 2012). A l'inverse, dans les neutrophiles de souris, la déplétion de la famille tyrosines kinases Syk n'a pas eu d'influence sur la réponse des cellules induite par le fMLP (Mócsai A et al, 2003).

Le mécanisme d'activation des tyrosines kinases par les RCPG reste peu connu. Des études ont indiquées que les tyrosines kinases de la famille des Src, étaient activées par la  $\beta$ -Arrestine directement couplée sur le récepteur aux chimiokines CXCR1 des granulocytes (Barlic J et al, 2000). Une interaction directe entre les Src et la protéine G couplée aux RCPG a été proposée dans d'autres modèles cellulaires. Ainsi, l'activation des tyrosines kinases de la famille des Src par les RCPG des neutrophiles semblerait se produire parallèlement à l'activation de la voie des PLC $\beta$  et de la PI3K $\gamma$  (McGarrigle D et al, 2007).

Ainsi, les tyrosines kinases régulent certaines fonctions du neutrophile par l'intermédiaire de la régulation de l'activation des protéines Rac. Dans les détails, les tyrosines kinases se situent en aval de la sous-unité G $\alpha_i$  du fPR et sont activées suite à la stimulation du récepteur. Les tyrosines kinases induisent l'activation de Rac via la phosphorylation et l'activation de la Vav1. En retour, Vav1 qui porte une fonction Gef entraîne l'activation de Rac via le remplacement du GDP par le GTP (Mócsai A et al, 2002).

## 4.7 Les protéine kinases C

Les protéines kinases C (PKC) désignent une famille d'enzymes kinases ubiquitaires qui contrôle le fonctionnement d'autres protéines en catalysant la phosphorylation de groupements hydroxyles de sérines ou thréonines. On dénombre 15 isoformes des PKC qui sont regroupés selon 3 sous-familles : Les PKC conventionnelles (cPKC), les PKC nouvelles (nPKC) et les PKC atypiques (aPKC). Toutes ces PKC possèdent un domaine catalytique C-terminal et un domaine régulateur N-terminal. La région catalytique est hautement conservée entre les isoformes au contraire de la partie régulatrice responsable de l'activation différente des PKC.

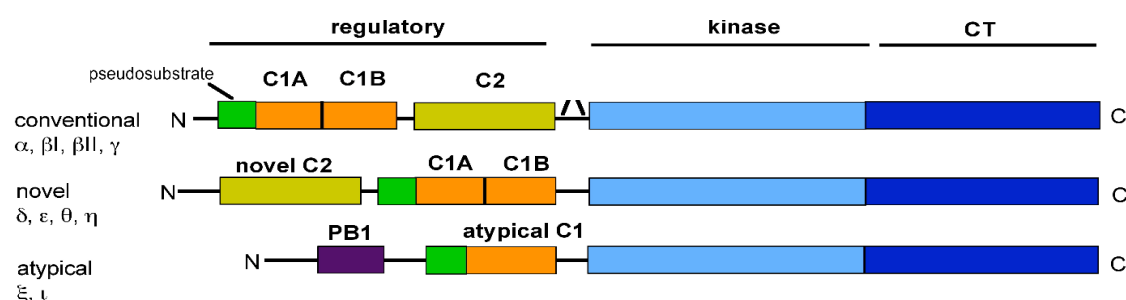


Schéma 26 : Les isoformes des PKC (adapté à partir de Newton et al, 2010)

#### **4.7.1 Les PKC conventionnelles**

Elles regroupent les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ . Suite à l'activation du fPR la protéine G active la PLC $\beta$  qui clive à son tour le phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate (PIP3) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1-4-6-trisphosphate (IP $_3$ ). L'IP $_3$  permet l'augmentation du calcium cytosolique en interagissant avec les canaux calciques du réticulum endoplasmique. Le calcium se lie au domaine régulateur C2 de la PKC et facilite sa translocation vers la membrane. Le DAG se fixe alors sur le domaine C1 pour activer la kinase. Le domaine C1 est aussi la cible du PMA, activateur direct des PKC.

#### **4.7.2 Les PKC nouvelles**

Elles regroupent les isoformes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ . Elles ne possèdent pas le domaine C2 qu'on retrouve chez les cPKC et sont donc insensibles à l'élévation de la concentration de calcium cytosoliques. Elles ont néanmoins le domaine C1 de liaison avec le DAG et le PMA. Elles sont activées par le DAG mais ne nécessitent pas d'élévation de la concentration du calcium cytosolique.

#### **4.7.3 Les PKC atypiques**

Elles regroupent les isoformes  $\zeta$ . Etant donné qu'elles ne possèdent ni les domaines C1 et C2, elles sont insensibles au calcium et ne répondent ni au PMA ni au DAG. Au lieu de cela elles sont activées par la PDK1 qui se trouve en aval de la PI3K (Chou MM et al, 1998), par PIP3 et RAS. Leur activation requiert des mécanismes impliquant des phosphoinositides et de multiples phosphorylations (Nishizuka Y et al, 2001).

#### **4.7.4 Les fonctions des neutrophiles dépendantes des PKC**

##### **a) L'arrêt et l'adhésion des neutrophiles**

Certains travaux ont pointé le rôle des PKC dans l'activation des intégrines qui se lient aux chimiokines présentes sur les cellules endothéliales. En effet, chez des souris déficientes pour la PKC $\delta$ , les auteurs ont pu remarquer que l'adhésion des neutrophiles à une plaque traitée au sérum de veau fœtal était réduite (Chou MM et al, 1998). D'autres travaux ont également impliqué la PKC $\zeta$  dans l'adhésion des neutrophiles au fibrinogène (Laudana et al, 1998).

##### **b) La phagocytose**

Les PKC ont été impliquées dans la phagocytose par les macrophages. Ils partagent avec les neutrophiles des similarités dans la manière dont cette fonction est réalisée indiquant que les PKC pourraient être impliquées également dans la phagocytose des neutrophiles.

c) L'explosion oxydative

Les PKC sont des activateurs clés de la NADPH oxydase puisque la stimulation des neutrophiles avec le PMA entraîne une forte réponse oxydative (DeChatelet LR et al, 1976). Dans des modèles acellulaires les PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\zeta$  ont phosphorylé la p47<sup>phox</sup> et initié la génération d'anion superoxyde. L'équipe d'accueil a contribué à identifier les PKC des neutrophiles, notamment la PKC  $\zeta$  qu'elle a impliqué dans l'explosion oxydative via la phosphorylation de la p47<sup>phox</sup> (Dang PM et al, 1994 ; Dang PM et al, 1995 ; Dang PM et al, 2001 ; Fontayne A et al, 2001).

d) Dégranulation

L'implication des PKC dans la dégranulation est controversée. La dégranulation peut être initiée par une activation des RCPG via le fMLP mais aussi via une stimulation par le PMA. La déficience en PKC $\delta$  dans les neutrophiles a entraîné une importante réduction de la libération de la lactoferrine après stimulation par fMLP ou PMA (Chou MM et al, 1998). Cependant, la déplétion des PKC $\alpha$  dans des lignées HL60 différenciées n'a pas eu d'impact (Korchak HM et al, 2007).

## 5 - La protéine “mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)”

La protéine mTOR pour « mammalian Target Of Rapamycin », « mechanistic Target Of Rapamycin », FRAP ou encore RAFT1 est une protéine kinase ubiquitaire atypique qui joue un rôle important dans la survie, la mobilité et la prolifération cellulaire notamment dans les cancers (Foster DA, 2009). Son activité est inhibée par la Rapamycine (Sirolimus), un antibiotique utilisé comme anticancéreux et immunosuppresseur (Ponziani F et al, 2011). Son gène est localisé sur le chromosome 1 en position 1p36.2, et code pour une protéine de 289 kDa. Découverte dans les eucaryotes primitifs, la protéine TOR (Target of Rapamycin) avait une contribution majeure dans la régulation de la consommation énergétique en jouant le rôle d'interface entre les périodes de croissance et de carence de l'organisme. Dans les premiers organismes eucaryotes unicellulaires, la protéine TOR leur permettait de « sentir » la disponibilité des nutriments et permettait donc leur prolifération dans des milieux favorables. Chez les premiers eucaryotes pluricellulaires, TOR a acquis plusieurs nouveaux rôles comme régulateur central de la croissance de l'organisme et de son homéostasie et s'est ensuite enrichie en nouvelles fonctions avec l'évolution des espèces (van Dam TJ et al, 2011). Ce sont des approches génétiques et biochimiques chez les levures ou certains mammifères ainsi que l'utilisation de mutants qui ont mis en évidence que la protéine TOR était bel et bien la cible du médicament Rapamycine déjà largement décrit jusque-là (Heitman J et al, 1991). L'équivalent de TOR est alors retrouvé chez les mammifères sous la forme de Sérine/Théronine protéine kinase ubiquitaire mTOR. Elle représente l'une des rares enzymes qui fonctionnent au sein de deux complexes distincts nommés mTOR complex 1 (mTORC1) et mTOR complex 2 (mTORC2) qui assurent à mTOR sa restriction aux substrats et qui permet à la protéine kinase de réguler de nombreuses fonctions biologiques distinctes.

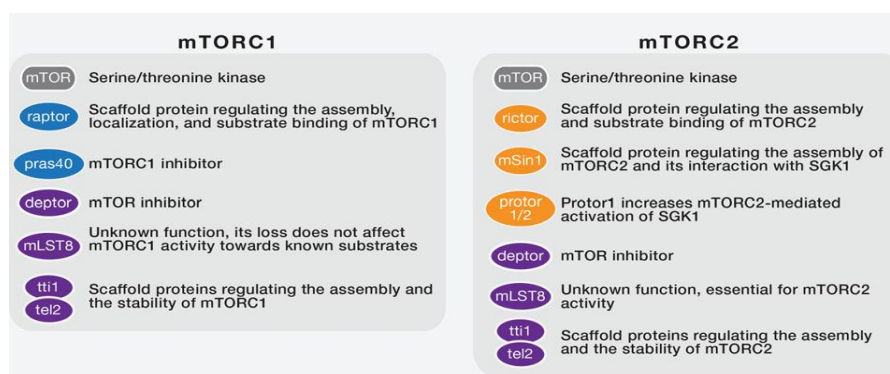


Tableau 7 : Composition des complexes mTORC1 et mTORC2 (Sabatini et Laplante Cell 2012)



## 5.1 Structure de mTOR et de ses complexes

### 5.1.1 Structure de mTOR

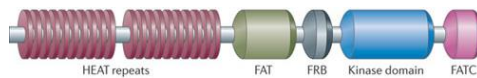


Schéma 27 : La structure secondaire de mTOR (Don B. and al, Nature Reviews Drug Discovery 2011)

mTOR est une protéine kinase de grande taille mais à l'allure compacte et formée de nombreux domaines (Schéma 27). La région N-terminale possède 20 tandem Heat (**H**untington, **E**F3, **A** subunit of PP2A, **T**OR1) répétés dont chaque unité consiste en 2 hélices  $\alpha$  d'environ 40 acides aminés. Ce type de motif n'est pas propre à mTOR et se retrouve dans d'autres protéines à commencer par son partenaire RAPTOR mais sa fonction n'est pas encore connue. Le domaine FAT (**F**RAP, **A**TM, **T**RAP), de taille élevée, est composé d'hélices  $\alpha$  répétées et est attaché au domaine kinase de mTOR. Un autre domaine nommé FATC se retrouve en partie C-terminale de mTOR, sa position centrale dans le site catalytique de la protéine fait qu'elle est absolument nécessaire pour l'activité kinase de mTOR, Takahashi et al. ont montré qu'une délétion d'un seul acide aminé de ce domaine inhibe l'activité de mTOR (Takahashi T et al, 2000). Le domaine FRB (**F**KB12-**R**apamycin **B**inding) jouxte le domaine catalytique et participe à l'activité kinase, il est également le site de fixation de l'acide phosphatidique qui participe à l'activation de mTOR (Fang Y et al, 2001). Enfin, le domaine kinase de mTOR est composé d'environ 550 résidus et adopte une structure en deux lobes (Schéma 28) : Le lobe N-Terminal, un plus large lobe C-Terminal et entre les deux, une région qui lie l'ATP.

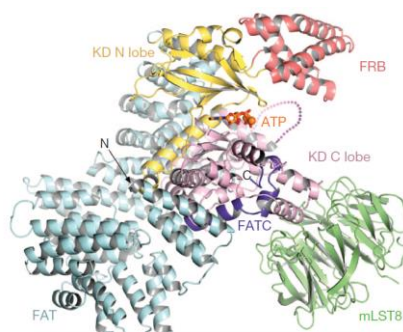


Schéma 28 : La structure tertiaire de mTOR-mLST8 (Yang H. and al, Nature 2013)

Le domaine kinase de mTOR ressemble fortement à un domaine PI3K avec néanmoins quelques différences puisque seuls 50% des acides aminés se superposent et plus de 200 s'additionnent, tel que le domaine FRB. Les 4 hélices de ce domaine font partie du lobe N-terminal et dessinent la porte d'entrée et de restriction pour les substrats.

La kinase mTOR est associée à au moins deux partenaires uniques qui permettent de former deux complexes distincts: « regulatory-associated protein of mTOR » (RAPTOR) pour mTORC1 et « rapamycin-insensitive companion of mTOR » (RICTOR) pour mTORC2. Ces différents compagnons participent à l'assemblage du complexe et facilitent l'accrochage des substrats et régulateurs de mTOR (Nojima J. et al, 2003).

### 5.1.2 Structure de mTORC1

Le complexe mTORC1 est formé de l'association de mTOR avec RAPTOR, PRAS40, et mLST8 et DEPTOR. De nouveaux partenaires transitoires émergent.

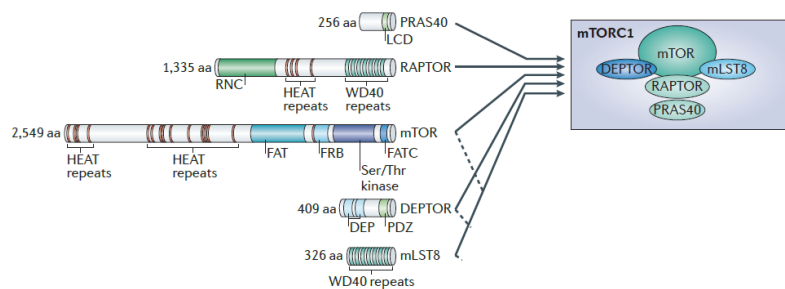


Schéma 29 : Structure de mTORC1 et de ses composants (Sabatini et al. Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010)

#### a) RAPTOR

La plus grosse protéine associée à mTOR est composée de trois domaines : un domaine constitué de répétitions de domaines WD40 sert de squelette aux complexes protéiques et permet à la protéine de s'accrocher à mTOR au sein de mTORC1. Un domaine RNC (RAPTOR N-terminal conserved) qui contribue à l'association de mTORC1 à ses substrats (Dunlop EA et al, 2009) et tout comme pour mTOR, un domaine composé de tandem Heat.

#### b) mLST8

Elle est composée d'une répétition de domaine WD40 qui permet également à la protéine de s'accrocher à mTOR au sein de mTORC1 mais également mTORC2. Sa position fait qu'elle participe à la porte d'entrée des substrats pour le site catalytique de mTOR.

#### c) DEPTOR

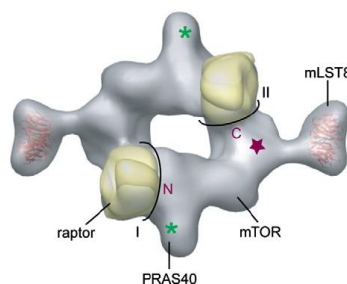
Elle a une expression régulée à la fois par mTORC1 et mTORC2 et est composée de deux domaines, DEP (**d**isheveled, **e**gl-10, **p**leckstrin) et PDZ (**p**ostsynaptic density 95, **d**iscs large, **z**onula occludens-1). La protéine se lie à la partie C-terminale de mTOR (Complexe 1 ou complexe 2) en aval de son domaine kinase et régule son activité. L'absence de DEPTOR, notamment dans certains cancers,

entraîne l'activation constitutive du complexe mTORC1 mais également de mTORC2, ce qui suggère un rôle d'inhibiteur de DEPTOR sur l'activité kinase de mTOR.

#### d) PRAS40

La protéine PRAS40, le plus petit partenaire du complexe mTORC1, est composée de deux régions riches en proline en N-terminale et d'un domaine LCD très conservé et qui peut être phosphorylé par AKT.

Une fois le complexe mTORC1 assemblé, il forme un dimère qui met en évidence une cavité centrale entourée par les protéines mTOR et RAPTOR (Schéma 30).

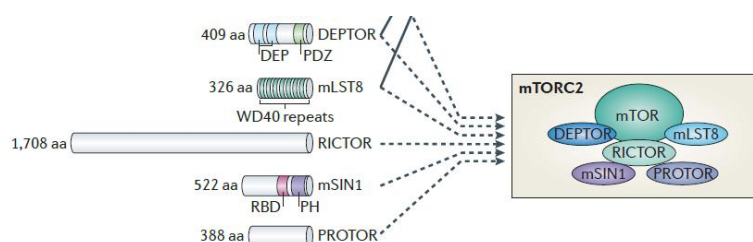


**Schéma 30 : Reconstitution 3D de la dimérisation de mTORC1 (Yip CK. et al. Mol. Cell 2010)**

Cette configuration jouerait un rôle important au niveau des substrats, Yip CK et al., suggèrent que 4E-BP1 (substrat de mTOR qui sera décrit ultérieurement) s'accroche à RAPTOR d'un seul monomère mTORC1 mais est phosphorylé par le mTOR du monomère adjacent. A l'inverse, l'absence de la dimérisation empêche la phosphorylation de 4E-BP1 (Yip CK et al, 2010).

### 5.1.3 Structure de mTORC2

mTORC2 possède un cœur très conservé entre la levure et l'Homme qui comprend : mTOR, RICTOR, SIN1 et mLST8. D'autres partenaires moins conservés entre les espèces s'ajoutent : PROTOR, PRR5L et DEPTOR.



**Schéma 31 : Structure de mTORC2 et de ses composants (Sabatini et al. Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010)**

RICTOR et PROTOR ont des structures très peu connues, les deux sont capables d'interagir l'un avec l'autre en absence de mTOR.

a) Le partenaire mSIN1

Tout comme RICTOR est essentiel pour maintenir la stabilité du complexe mTORC2. En absence de mSIN1, RICTOR n'est plus exprimée, et inversement, alors que l'expression de mTOR n'est pas affectée (Frias MA et al, 2006). mSIN1 a une expression particulière puisqu'elle subit un épissage alternatif permettant la génération de cinq isoformes dont trois d'entre eux permettent la formation de trois complexes différents de mTORC2 (Frias MA et al, 2006) ; cependant aucune fonction spécifique à ces isoformes n'est connue. Les deux plus longs isoformes possèdent un domaine pleckstrin homology (PH) permettant leur liaison à des lipides, à l'acide phosphatidique, phosphatidylinositol et aux membranes cellulaires ainsi qu'une région Ras-binding domain (RBD) permettant de lier Ras actif et d'inhiber sa signalisation (Schroder WA et al, 2007).

b) mLST8

Il s'agit d'une protéine commune à mTORC1 et mTORC2, cependant une déficience de l'expression mLST8 affecte la liaison de mTOR avec RICTOR sans affecter sa liaison avec RAPTOR et donc empêche l'assemblage de mTORC2 sans affecter l'assemblage de mTORC1 (Guertin DA et al, 2006).

## **5.2 Fonctions et substrats de mTORC1**

### **5.2.1 Généralités**

Les fonctions que le complexe active dépendent de l'état et des besoins des cellules et c'est ainsi que le complexe mTORC1 permet la synthèse protéique lorsque le niveau d'acides aminés est suffisant. Lorsque ce niveau est réduit, mTORC1 est inhibé, ce qui entraîne l'activation des voies qui régulent l'autophagie et permet d'augmenter le niveau d'acide aminé. Dans ces conditions d'abondance énergétique, mTORC1 participe également au stockage de cette énergie en étant impliquée dans la production d'acides gras qui permettront aux cellules de trouver des réserves énergétiques en cas de carence. Toutes ces fonctions permettent à mTOR de contrôler l'homéostasie énergétique de la cellule. mTORC1 participe donc directement ou indirectement à de nombreuses fonctions biologiques dépendantes de cette énergie allant du métabolisme à la défense immunitaire.

## 5.2.2 La synthèse protéique

### a) S6K1 et 4E-BP1

Deux des substrats connus de mTORC1, impliqués dans les processus d'initiation de la traduction protéique, eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) et S6 kinase 1 (S6K1) s'associent à RAPTOR au niveau d'un motif TOS (TOR signaling) (Nojima J. et al, 2003) hautement conservé dans la partie N-terminale de S6K1 et C-terminale de 4E-BP1. La séquence consensus est de la forme F-(D/E)-(F/I/L/M)-(D/E)-(L/I) (Oshiro N et al, 2007). mTORC1 est recruté par le facteur d'initiation de la traduction eIF3 au niveau des ARN non transcrits pour phosphoryler S6K1 et 4E-BP1.

Dans sa forme non phosphorylée, 4E-BP1 agit comme un régulateur négatif de la traduction en se fixant sur le facteur d'initiation eIF4E (Ma XM et Blenis J, 2009). mTORC1 actif provoque la phosphorylation séquentielle de 4E-BP1 (Schéma 32) : Dans un premier temps les phosphorylations des Thr 37 et Thr 46, montrées *in vitro* comme des étapes nécessaires, permettent ensuite la phosphorylation de la Thr 70 puis Ser 65 (Gingras AC et al, 2001). Ainsi, phosphorylée P-4E-BP1 se détache et libère le facteur d'initiation de la traduction eIF4E.

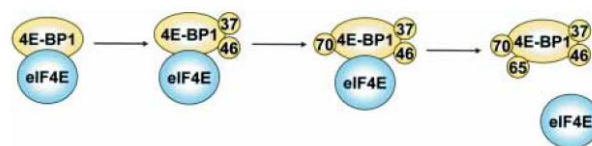
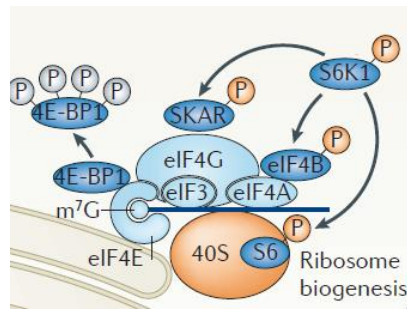


Schéma 32 : Phosphorylation séquentielle de 4E-BP1 par mTOR (Hay et Sonenberg, Genes & Development 2004)

eIF4E peut alors recruter un autre facteur de l'initiation de la traduction eIF4G à l'extrémité 5' de la plupart des ARN messagers (Ma XM et Blenis J, 2009).

La kinase mTORC1 phosphoryle également S6K1 sur de nombreux sites dont la thréonine 412, située dans un motif hydrophobe proche du site catalytique, qui est étroitement liée à l'activité de la kinase (Weng QP et al, 1998). En retour, S6K1 s'associe et phosphoryle de nombreuses protéines impliquées dans la traduction telles que le facteur d'élongation eIF4B qui permet l'augmentation de l'activité de l'hélicase eIF4A afin d'améliorer l'accessibilité des régions 5'UTR de nombreux ARN messagers. Le facteur d'élongation eEF2K, SKAR (également nommé POLDIP3), NCBP1 ou encore la sous unité ribosomique S6 sont également activés par S6K1.

Ensemble, les phosphorylations de S6K1 et 4E-BP1 par mTORC1 permettent donc de former un complexe contrôlant l'initiation de la traduction et son élongation (Schéma 33).



**Schéma 33 : Les substrats de mTORC1 participent à l'initiation de la traduction et son élongation (Schéma adapté à partir de Sabatini et al., Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010)**

#### b) HIF1 $\alpha$

HIF1 $\alpha$  et mTORC1 partagent des fonctions biologiques communes : HIF1 $\alpha$  augmente l'expression des gènes qui entrent dans la glycolyse et le transport du glucose afin de maintenir le niveau d'énergie lorsque la respiration cellulaire est réduite. A l'inverse l'inhibition de mTOR par la Rapamycine réduit l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse (Düvel K. et al, 2010). En contrôlant l'expression ou l'activité de HIF1 $\alpha$ , le complexe mTORC1 contrôle donc le programme de transcription qui permet aux cellules de maintenir leur état dans des conditions de manque d'oxygène. Dans des lignées cancéreuses où mTORC1 est fortement actif, l'expression de HIF1 $\alpha$  est élevée, ceci suggère l'implication de mTORC1 dans son expression (Brugarolas JB. et al, 2003) cela implique 4E-BP1 ainsi que le facteur eIF4E (Düvel K. et al, 2010).

Dans le neutrophile, HIF1 $\alpha$  régule les fonctions antibactériennes, la production des protéases et des peptides antimicrobiens contenus dans les granules (Perssonaux C. et al, 2005). Il contribue en outre à prolonger la survie des neutrophiles en condition d'hypoxie en inhibant l'apoptose des cellules (Walmsley SR. et al, 2005). Il serait ainsi important d'évaluer la contribution de mTOR dans ces activités contrôlées par HIF1 $\alpha$ .

#### c) STAT3

mTORC1 reconnaît STAT3 via le motif TOS se trouvant reconnu par RAPTOR (Inoki K et al, 2005). mTOR le phosphoryle et active le facteur de transcription STAT3 au niveau de la Ser-727 (Yokogami K et al, 2000). STAT3 est souvent retrouvée activée durant les infections virales, par exemple le virus de l'hépatite C entraîne l'augmentation d'expression et l'activation de STAT3 dans les monocytes, macrophages et cellules dendritiques par l'intermédiaire de l'IL6 (Tacke RS et al, 2011), or l'activation de STAT3 est également un facteur de mauvais pronostic car il a la capacité de promouvoir des oncogènes tumoraux. Ainsi, mTORC1 devrait également jouer un rôle important durant les infections virales.

La biosynthèse des ribosomes met en jeu les ARN polymérases I, II et III impliquées respectivement dans la synthèse des ARN ribosomiaux, la transcription des gènes codants pour les protéines ribosomales et la synthèse de l'ARN 5S.

The diagram illustrates the mTOR signaling pathway. At the top, 'Nutrients' (yellow dots) activate mTOR (green oval). On the left, 'IGF-1' (orange oval) activates 'PI3K' (orange oval), which activates 'Akt/PKB' (orange oval). 'Akt/PKB' inhibits 'TSC1/2' (green oval), which in turn inhibits 'Rheb' (green oval). 'Rheb' activates 'mTOR'. 'Rapamycin' (green oval) inhibits 'mTOR'. 'mTOR' activates 'S6K1' (green oval), which inhibits 'pRb' (blue oval). 'pRb' inhibits 'Cyclin D4' (blue oval). 'Cyclin D4' activates 'pRb'. 'mTOR' also activates 'TIF-1A' (red oval). 'TIF-1A' activates 'Pol I' (grey oval). 'UBF' (red oval) and 'SL1' (red oval) are also involved in 'Pol I' activation. A dashed line indicates that 'IGF-1' also has a direct effect on the pathway leading to 'Pol I' activation.

90



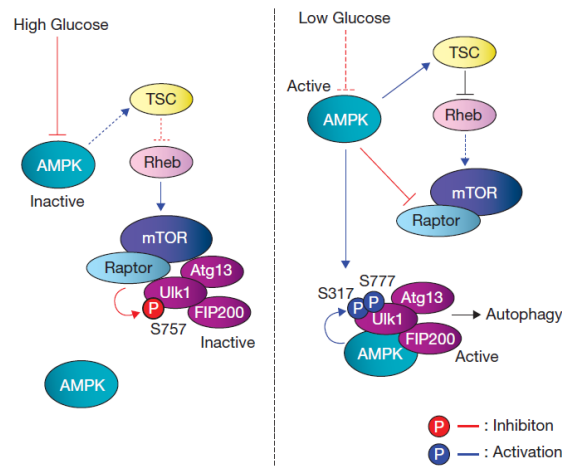


Schéma 35 : Modèle proposé expliquant la régulation de phosphorylation d'ULK1 et de l'autophagie par mTORC1 (Kim et al., Nat Cell Biol 2011)

### 5.2.5 La synthèse lipidique

Le complexe mTORC1 joue un rôle central dans la biosynthèse des lipides. En effet, la Rapamycine réduit l'activité de la Lipin 1, SREBPS et du récepteur PPAR $\gamma$ , tous trois impliqués dans l'adipogénèse (Kim JE et Chen J, 2004). mTORC1 induit la phosphorylation de la Lipin 1 au niveau des Ser-106 et la Ser-472 ce qui entraîne alors son exclusion du noyau. A l'inverse, lorsque mTORC1 est inhibé, Lipin 1 s'accumule dans le noyau et entraîne l'association de SREBPs à la matrice nucléaire ce qui l'empêche d'activer ses gènes cibles impliqués dans la biosynthèse des lipides (Peterson TR et al. 2011) (Schéma 36). L'augmentation de la biosynthèse de lipides est souvent un marqueur de prolifération des cellules cancéreuses, étant donné la contribution de mTORC1 dans cette biosynthèse lipidique, il pourrait avoir un possible rôle dans l'initiation des tumeurs.

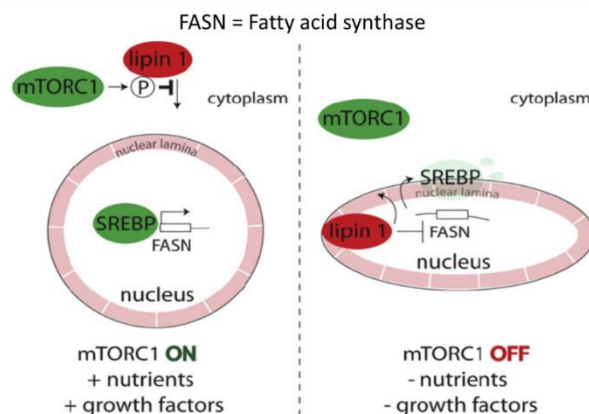


Schéma 36 : Modèle proposé pour la régulation de l'activité transcriptionnelle de SREBP par mTORC1/Lipin1 (Peterson TR et al. Cell 2011)



Le complexe mTORC1 est également impliqué dans le stockage énergétique par l'intermédiaire des tissus adipeux. En effet, le complexe module l'expression et l'activité de PPAR $\gamma$ , récepteur nucléaire qui contrôle l'expression de gènes requis pour la synthèse d'acides gras. Cependant le mode d'action n'est que partiellement élucidé, d'un côté l'axe mTORC1-4EBP1 est impliqué dans la régulation de la traduction de PPAR $\gamma$  (Le Bacquer O et al, 2007) et de l'autre côté Kim et al. ont soulevé la possibilité que mTORC1 pourrait contribuer à l'activation de PPAR $\gamma$  par l'intermédiaire de SREBP1 qui a été montré comme augmentant la production endogène du ligand de PPAR $\gamma$  (Kim JE et Chen J, 2004).

## 5.3 Fonctions de mTORC2

mTORC2 est impliqué dans bon nombre de processus biologiques qui découlent des phosphorylations d'AKT, SGK1 et des PKC (Schéma 37) à savoir la synthèse protéique, les fonctions métaboliques, la survie cellulaire ou encore la réorganisation du réseau d'actine.

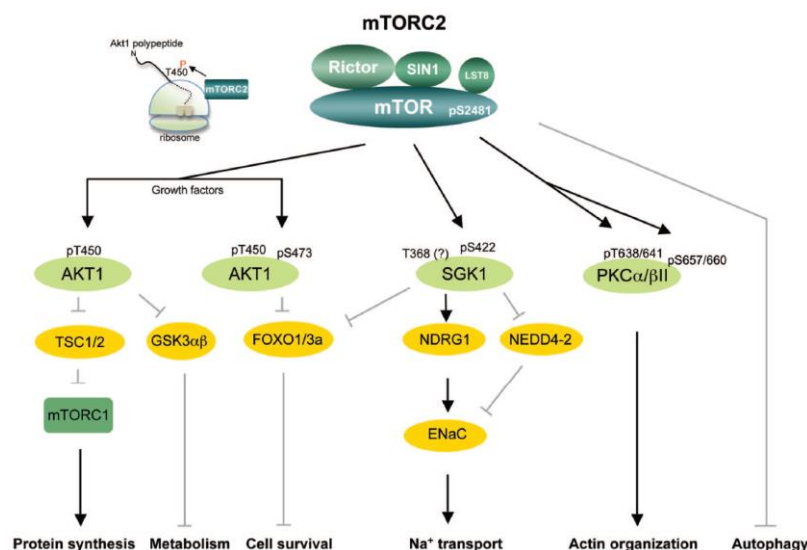


Schéma 37 : Fonctions directes et indirectes de mTORC2 (Oh & Jacinto, Cell cycle 2011)

### 5.3.1 L'organisation de l'actine et la migration cellulaire

Les délétions géniques de mTor, Rictor, mLst8 au contraire de Raptor désorganisent le réseau d'actine et entraînent une diminution de l'activation de Rac1, cependant la manière dont mTORC2 pourrait contrôler l'organisation de l'actine reste incertaine. La migration des cellules est étroitement dépendante de la réorganisation du réseau d'actine et de Rac1, or mTORC1 et mTORC2 peuvent s'associer à Rac1 (Saci A et al, 2011). Ensuite, la protéine Rex, membre de la famille des Rho-GEF, s'associe à mTOR ce qui induit l'activation de Rac ainsi que la migration des cellules en présence

de leucine (Henandez-Negrete I et al, 2007). Cependant, cette migration est insensible à la Rapamycine suggérant alors que mTORC2 joue un rôle central dans cette migration dépendante de la leucine. Une contribution de mTORC2 et de Rac1 dans la migration cellulaire et les métastases tumorales a été mise en évidence et vient donc renforcer l'importance de mTORC2 dans la migration cellulaire (Gulhati P et al, 2011). Le mécanisme précis par lequel mTORC2 contrôle la réorganisation du réseau de F-Actine est discuté, ceci pourrait faire intervenir l'activation des PKC (Sarbasov DD et al, 2004). Nous reviendrons plus en détail sur ces points ultérieurement. RICTOR a également été montrée comme s'associant aux PKC $\zeta$  et comme modulant le chimiotactisme dans le cancer du sein, cependant cette fonction est propre à RICTOR et indépendante de mTORC2 (Zhang F et al, 2010).

### 5.3.2 La synthèse protéique

Le complexe mTORC2 participe à l'activation d'AKT, ce point sera détaillé ultérieurement. En retour, AKT joue un rôle central dans l'activation de mTORC1, de ce fait, mTORC2 participe à la synthèse protéique via mTORC1. Cependant, un rôle direct de mTORC2 peut être suggéré par sa capacité à s'associer à la sous unité 60S du ribosome et la formation d'une association stable avec les protéines ribosomiques à la sortie du tunnel de traduction (Oh WJ et al, 2010). mTORC2 permet d'amplifier la synthèse protéique dans les cellules en permettant la mise en place ou en stabilisant le polysome (Zinzalla V et al, 2011) (Schéma 38). Lorsque la formation du complexe mTORC2 est empêchée alors l'association de mTOR avec le ribosome est réduite et la formation des polysomes est fortement diminuée (Oh WJ et al, 2010).

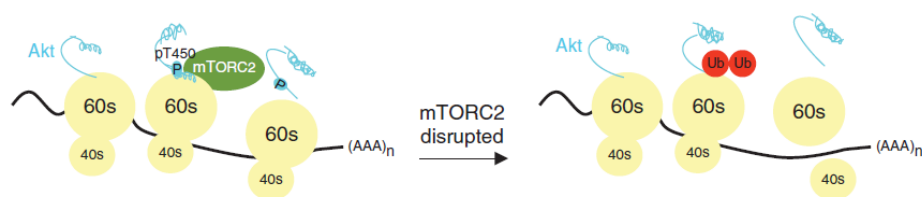


Schéma 38 : mTORC2 régule la stabilité du polysome (Oh WJ and al, EMBO J 2010)

### 5.3.3 L'autophagie

Etant donné que mTORC2 est impliqué dans l'activation de mTORC1, le complexe mTORC2 devrait jouer un rôle indirect dans l'inhibition de l'autophagie mais la question de la contribution directe du complexe reste soulevée. Une étude a montré que la Rapamycine ou la Torin 1, inhibiteur de mTORC1 et mTORC2, induisait le même degré d'autophagie (translocation de LC3 vers l'autophagosome) dans les lignées Rictor<sup>-/-</sup>, où le complexe mTORC2 est absent, que les lignées

contrôles. Ceci suggère fortement que c'est mTORC1 qui joue un rôle direct dans l'autophagie et non mTORC2 (Thoreen CC et al, 2009).

### 5.3.4 Le métabolisme

Il s'agit d'un domaine peu exploré. La majorité des études a été réalisée dans *Caenorhabditis elegans*. Chez les mammifères dans des fibroblastes n'exprimant pas RICTOR, l'activité métabolique a été en grande partie diminuée alors qu'à l'inverse dans des lignées Jurkat un KO de Rictor augmente la respiration mitochondriale.

## 5.4 Localisation et expression

### 5.4.1 Localisation dans l'organisme

La protéine mTOR est ubiquitaire et elle participe à des fonctions clés de la survie des cellules : Synthèse protéique, prolifération, croissance. Cependant, c'est dans les cellules qui font le plus appel à ces fonctions biologiques que mTOR est la plus exprimée. Ainsi l'expression du gène de mTOR est fortement augmentée dans les testicules, le tube séminifère, le foie, le cœur, et dans de nombreuses cellules du cerveau qui sécrètent de grandes quantités d'hormones. Au niveau des différents types cellulaires mTOR est fortement exprimée dans les progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse qui sont amenés à se multiplier activement ainsi que dans les lymphocytes NK.

L'expression des gènes RAPTOR et RICTOR constituant essentiels de mTORC1 et mTORC2 respectivement est remarquablement constante entre tous les organes et les différents types cellulaires.

### 5.4.2 Localisation subcellulaire de mTORC1

#### a) La surface du lysosome

mTOR est directement activée par Rheb lié au GTP à la surface du lysosome. Cela requiert tout d'abord la translocation de mTOR selon un processus stimulé par les nutriments et les protéines Rags mais également l'activation de Rheb par ses protéines GAP (TSC1 et TSC2) qui se trouvent eux aussi au niveau de la membrane du lysosome. Ce mécanisme sera décrit en détail ultérieurement. Cependant, l'imagerie subcellulaire ainsi que les informations sur les fonctions de mTOR dans la transcription et la traduction suggère d'autres localisations possibles de la kinase.

#### b) Dans le noyau

Des composants de mTORC1 incluant mTOR, Raptor et S6K ont été détectés dans le noyau où ils participeraient à la régulation de la transcription ; cependant, ces composants ne semblent pas former un complexe mTORC1 actif (Rosner M, Hum Mol Genet 2008).

c) Au niveau de la membrane plasmique

De récentes données suggèrent que le domaine WD40 de Raptor serait capable de se lier au lipide PI(3,5)P<sub>2</sub> et ainsi entraîner la relocalisation de mTORC1 au niveau de la membrane plasmique. Cependant, ce phospholipide est rare et sa localisation varie en fonction du type cellulaire.

d) Dans le cytoplasme

En absence d'acide aminé, mTOR est localisée de manière diffuse dans le cytoplasme. Cependant, même étant active, elle pourrait avoir une fonction dans le cytoplasme. En effet, mTORC1 est associée avec le facteur d'initiation de la traduction eIF3 et phosphoryle 4EBP1, des événements se déroulant dans le cytoplasme.

### **5.4.3 Localisation subcellulaire de mTORC2**

a) A l'interface entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie

mTORC2 interagit avec les protéines Hsp70 et Grp58 présentes dans le réticulum endoplasmique. Le complexe mTORC2 a également été retrouvé associé à la mitochondrie dans une région associée au réticulum endoplasmique nommée MAM (Mitochondria-Associated ER Membrane) et qui facilite le transfert de lipides et de calcium entre les deux organelles.

b) Au niveau de la membrane plasmique

Le complexe mTORC2 et son substrat AKT ont été isolés au niveau des radeaux lipidiques (lipid raft) qui sont traditionnellement associés à la membrane plasmique, de plus mSIN1 possède un domaine Plextrin Homology qui suggère là aussi une association aux niveaux des membranes. Néanmoins, des radeaux lipidiques peuvent aussi se retrouver au niveau du réticulum endoplasmique (au niveau des MAM précédemment évoqués). Or l'évaluation de la localisation de Rictor par immunofluorescence ou fractionnement subcellulaire suggère que seule une fraction minoritaire de mTORC2 serait associée à la membrane plasmique.

c) Dans le noyau

La présence du complexe a été rapportée dans le noyau (Rosner M, Hum Mol Genet 2008) cependant sa fonction y reste inconnue.

## **5.5 L'activation du complexe mTORC1**

### **5.5.1 La contribution de Rheb-GTP**

mTORC1 agit comme un senseur et son activité est connectée à l'environnement cellulaire. Les acides aminés à l'intérieur de la cellule, en particulier la leucine, sont des éléments indispensables pour l'activation de mTORC1 et leur mode d'action passe par la famille des petites GTPases Rag

(Schéma 39) (Xu G et al, 2001). L'activation de mTOR requiert également la GTPase RHEB et l'hétérodimère TSC1-TSC2. Les Rag GTPases sont des hétérodimères composés de RagA ou RagB associée à RagC ou RagD. En absence d'acide aminé, les Rag GTPases se retrouvent dans une conformation inactive où RagA/B est associée au GDP et RagC/D au GTP. A l'inverse, la présence d'acides aminés permet à l'hétérodimère de se retrouver dans une conformation active avec RagA/B associée au GTP et Rag C/D au GDP (Schéma 39). L'hétérodimère se lie ainsi à RAPTOR et entraîne la relocalisation de mTORC1 à la surface des endosomes tardifs et du lysosome (Sancak Y et al, 2008).

En parallèle, l'hétérodimère TSC1-TSC2 agit comme une GAP (GTPase activating protein) et maintient RHEB sous sa forme inactive RHEB-GDP à la surface du lysosome. Lorsque TSC1-TSC2 est inhibée, la conformation de RHEB-GDP change en RHEB-GTP active et peut directement participer à l'activation de mTORC1 à la surface du lysosome (Sancak Y et al, 2008).

Bai et al., ont examiné la contribution de la protéine FKBP-38 dans l'activation de mTORC1 : en étant fixée sur le domaine FRB de mTOR proche du domaine kinase, il empêche mTORC1 de phosphoryler ses substrats. Lorsque mTORC1, se retrouve sur la membrane lysosomiale alors RHEB-GTP, active, a la possibilité de s'associer à FKBP-38 et libère le site catalytique de mTORC1 (Bai X et al, 2007). Sun et al. pointent quant à eux la contribution importante de l'acide phosphatidique dans l'activation de mTORC1 et montrent que RHEB-GTP s'associe à la PLD1 pour promouvoir la génération d'acide phosphatidique et activer mTORC1 (Sun Y et al, 2008).

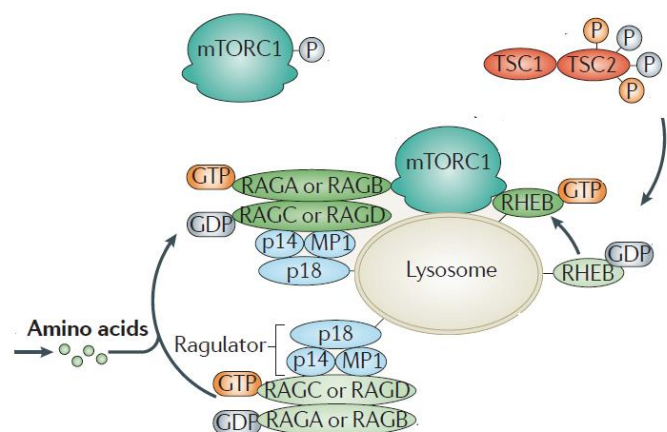


Schéma 39 : Activation de mTORC1 (Sabatini et al., Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010)

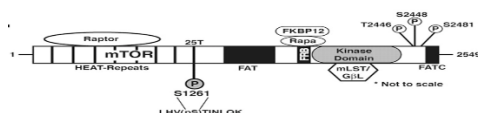
### **5.5.2 L'activation de mTORC1 par l'acide phosphatidique**

De nombreux travaux ont établi que le second messager lipidique, l'acide phosphatidique, est un médiateur clé de l'activation de mTORC1 et interagit avec le domaine FRB de mTOR (Fang Y et al, 2001). La translocation membranaire des protéines qu'il lie est un mode d'action majeur de l'acide phosphatidique. Cependant, il est également capable de réguler l'activité d'enzymes de manière allostérique (Stace CL et Ktistakis NT, 2006) et mTORC1 en fait partie. Dans un premier temps l'acide phosphatidique empêche l'action inhibitrice de FKBP-38, précédemment décrit, en s'y liant et en la décrochant de mTORC1, et par la suite est capable de se lier directement sur le domaine FRB de mTOR pour pleinement activer la kinase (Yoon MS et al, 2011). Sur le plan moléculaire, cette association de l'acide phosphatidique avec le domaine FRB implique différents résidus à la surface de mTOR. Le groupement phosphate de l'acide phosphatidique, négativement chargé, se lie à l'arginine 2109, positivement chargée, de mTOR. Un des deux groupements acyl profite des forces de Van Der Waals et occupe une partie du site de liaison de la Rapamycine : la Leucine 2031, la Phénylalanine 2039, le Tryptophane 2101 et la Tyrosine 2105 tandis que l'autre groupement acyl s'associe à une région voisine : l'Aspartate 2102, la Tyrosine 2105 et l'histidine 2106 (Veverka V et al, 2008).

Deux isoformes de la PLD génèrent l'acide phosphatidique : La PLD1 qui est généralement associée au noyau, l'endosome tardif ou encore lysosome (Freyberg Z et al, 2001) et la PLD2 qui est généralement associée à la membrane plasmique. Des travaux montrent qu'une déplétion de la PLD1 par ARN interférent dans les lignées HEK293 n'affecte pas la phosphorylation des substrats S6K et 4EBP1 au contraire d'une déplétion de PLD2. La PLD2 formeraient alors un complexe avec Raptor en se fixant sur le domaine WD40 à l'aide de son motif TOS et permettrait à l'acide phosphatidique d'activer très localement mTORC1 (Ha SH et al, 2006). A l'inverse, d'autres travaux dans les mêmes lignées avec les mêmes techniques de déplétion montrent la nécessité de la PLD1 (Fang Y et al, 2003 ; Yoon MS et al, 2011). Elle serait alors recrutée au niveau du lysosome par Vps34 (Yoon MS et al, 2011) puis activées par Rheb-GTP pour produire l'acide phosphatidique. Néanmoins, le fait que la PLD2 soit insensible à Rheb-GTP et impliquée dans l'activité de mTORC1 permet de considérer une activation de mTOR indépendante de Rheb et TSC1-TSC2 et dans d'autres compartiments cellulaires que l'endosome tardif. Ceci est à prendre en considération dans les cellules où la PLD2 prédomine par rapport à la PLD1, comme c'est le cas dans le neutrophile (Paruch S et al, 2006).

### **5.5.3 Sites de phosphorylation de mTOR dans le complexe mTORC1**

Au sein du complexe mTORC1, la kinase mTOR est phosphorylée sur plusieurs résidus, certains d'entre eux se situent entre le site catalytique et le domaine FATC (la sérine 2448, la sérine 24481 et la thréonine 2446) et un autre se situe à proximité du domaine HEAT, la sérine 1261.



**Schéma 40 : Localisation des sites phosphorylés de mTOR (Acosta-Jacquez HA, 2009)**

L'étude de ces sites de phosphorylation a permis d'avoir un aperçu des voies de signalisation qui participent à l'activation de la protéine. La sérine 1261 a récemment été identifiée pour sa contribution dans le mode d'action de mTORC1 (Acosta-Jacquez HA, 2009). Sa phosphorylation est insensible à la Rapamycine mais permet à mTORC1 de phosphoryler ses substrats S6K1 et 4EBP1 de manière dépendante de la présence d'acides aminés et à l'inactivation de l'hétérodimère TSC1/2. Cette phosphorylation semble être importante pour la translocation de mTORC1 à la membrane du lysosome.

La Sérine 2448 de mTOR est initialement décrite comme phosphorylée par la protéine kinase AKT en présence d'acides aminés et d'insuline. Mais plus récemment, le substrat de mTOR, S6K qui sera abordé ultérieurement, a été décrit comme pouvant être le principal acteur de la phosphorylation de la Ser-2448 (Chiang GG et Abraham RT, 2006), cette phosphorylation est donc un marqueur de l'activité de mTORC1. Cependant, les expériences de mutation de la Ser-2448 en alanine n'empêchent pas les substrats de mTORC1 d'être activés, ce qui suggère que cette phosphorylation n'est pas nécessaire à l'activation de mTORC1 mais n'est que la résultante de l'activité de mTOR (Sekulic A et al, 2000).

La sérine 2481 est phosphorylée dans le complexe mTORC2 et également mTORC1. Dans ce dernier, il s'agit d'une autophosphorylation de la kinase sensible à la Rapamycine, à la déprivation en acides aminés et aux inhibiteurs de la PI3K. Cette autophosphorylation nécessite la dimérisation de mTORC1 (Schéma 30) en position –cis où l'un des deux complexes phosphoryle la Ser-2481 de l'autre. Ainsi, tout comme pour la Ser 2448, la phosphorylation de la Ser-2481 reflète l'activité du complexe sans que sa contribution dans l'activation de mTORC1 ne soit pour l'instant élucidée (Soliman GA et al, 2010). Cependant, certains travaux pointent à l'inverse que la Ser-2481 reste insensible à un traitement court des cellules par la Rapamycine et à la déstabilisation de l'assemblage du complexe mTORC1 (Copp J et al, 2009).

La phosphorylation de la thréonine 2446 est régulée de manière opposée, elle est réalisée en cas de faible concentration de nutriment et inhibée par l'insuline : L'AMPK est donc un candidat sérieux pour cette phosphorylation. Alors que la phosphorylation de la Ser-2448 est associée à l'activation de mTOR, la phosphorylation de la Thr-2446 est à l'inverse associée à des conditions d'absence

d'activation de mTOR, lorsque les ressources de l'environnement sont faibles (Cheng SW et al, 2004).

## 5.6 Les voies d'activation de mTORC1

### 5.6.1 Rôle des facteurs de croissance dans l'activation de mTORC1

L'inhibition de l'hétérodimère TSC1-TSC2 est une étape clé dans l'activation de mTORC1. Elle est sensible à différents stimuli : Les cytokines, les nutriments, les facteurs de croissance, l'énergie et le stress pour enclencher les processus de synthèse protéique. Ceci fait de mTORC1 un intégrateur de ces signaux extracellulaires afin de réguler différentes activités de la cellule.

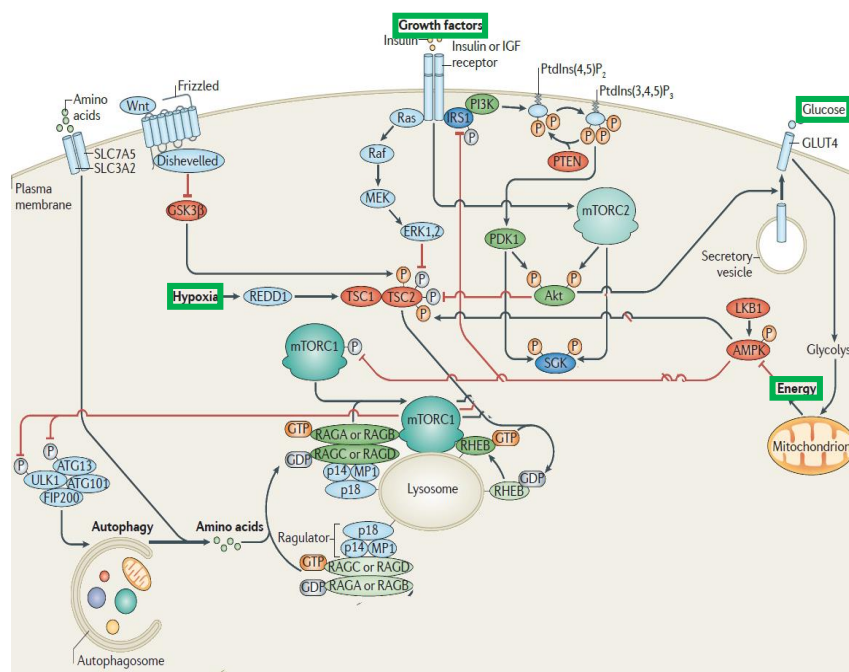


Schéma 41 : L'activation de mTORC1 intègre des signaux sur l'environnement extracellulaire comme intracellulaire (Adapté de Sabatini et al., Nature reviews Molecular Cell Biology, 2010)

La liaison de l'insuline ou de l'insulin-like growth factor à leur récepteur, active la voie PI3K avec notamment l'activation d'AKT et de ERK1/2 qui à leur tour phosphorylent TSC1-TSC2 et entraînent l'inhibition de l'hétérodimère (Inoki K et al, 2002 ; Ma L et al, 2005), et de cette manière RHEB n'est plus inhibée et peut activer mTORC1. AKT peut également phosphoryler PRAS40, entraînant son détachement du complexe mTORC1 vers la protéine 14-3-3, ce qui lève l'action inhibitrice de PRAS40 sur mTOR (Vander Haar E et al, 2007).



### **5.6.2 Rôle du stress et l'énergie dans l'activation de mTORC1**

Par l'intermédiaire de l'AMPK, mTORC1 est capable de « sentir » la concentration d'ATP : Lorsque le ratio AMP/ATP augmente, en cas de faibles concentrations d'ATP par exemple, l'AMPK est activée et phosphoryle l'hétérodimère TSC1-TSC2 sur la Ser-1345 permettant à GSK3 (voie Wnt) de phosphoryler l'hétérodimère sur de nombreux autres sites qui entraîne son activation. L'hétérodimère étant le répresseur naturel de mTOR, alors ces faibles conditions énergétiques entraînent donc l'inhibition de mTORC1 (Inoki K et al, 2006). L'AMPK pourrait également phosphoryler mTOR sur la Thr-2446 et l'inhiber (Cheng SW et al, 2004). Beaucoup de facteurs de stress diminuent le niveau d'ATP et entraînent l'inhibition de mTOR. Par exemple l'hypoxie contribue à réduire l'activité de la chaîne respiratoire diminuant donc le niveau d'ATP. Le stress hypoxique peut également inhiber mTORC1 de manière indépendante de l'AMPK en induisant l'expression de la protéine REDD1 qui promeut l'assemblage de l'hétérodimère TSC1-TSC2 et supprime l'activité de mTORC1 (DeYoung MP et al, 2008). Les dommages à l'ADN régulent également l'activité de mTORC1 via la protéine p53 qui induit l'augmentation de l'expression de l'AMPK.

### **5.6.3 Les effecteurs de l'inflammation**

Le complexe mTORC1 est une des cibles majeures de la kinase AKT. Elle-même, est activée via l'activation de la PI3-Kinase qui représente une porte d'entrée pour les signaux provenant des récepteurs liés à l'inflammation. Les PI3K sont activées par de nombreux types de récepteurs de l'immunité tels que les récepteurs d'antigènes, les récepteurs Fc, les récepteurs d'adhésion, les Toll-like Receptors (TLR) ou encore les récepteurs couplés aux protéines G (Récepteur du C5a ou fMLP) ; un bon nombre d'entre eux jouent un rôle actif durant l'inflammation. Ainsi, ces éléments permettent d'envisager que les médiateurs de l'inflammation soient en mesure d'activer mTOR via la PI3K et l'inhibition du complexe TSC1/2. C'est ainsi que divers médiateurs de l'inflammation sont capable d'activer mTOR. On peut citer par exemple le TNF $\alpha$  (Lee DF et al, 2007), les faibles concentrations de FRO [au contraire des fortes qui l'inhibent (Li M et al, 2010)] ou encore le LPS (Weichhart T et al, 2008) qui sont en mesure d'induire l'activation de mTORC1. Cette liste n'étant pas exhaustive. Nous reviendrons plus en détail sur l'implication de mTOR dans les fonctions du neutrophile et les maladies inflammatoires.

## **5.7 Voies d'activation de mTORC2 et substrats**

Les études du mode d'activation et des fonctions biologiques liées à mTORC2 ont longtemps accusé un retard sur celles liées à mTORC1 du fait de l'indisponibilité d'inhibiteurs spécifiques. Tout

comme pour mTORC1, l'activation de mTORC2 est également régulée par phosphorylation, au niveau de la Sérine 2481 qui est insensible à la Rapamycine. C'est donc grâce au développement de nouveaux inhibiteurs mais également des stratégies d'extinction génétique des composants du complexe qu'il a été possible d'ouvrir la voie à des nouvelles études autour de mTORC2. Le décryptage des signaux intracellulaires activant mTORC2 a en grande partie été initié par l'analyse de la phosphorylation d'un de ses substrats : la kinase AKT.

### **5.7.1 L'activation d'AKT par mTORC2**

Les premières analyses d'activités kinases *in vitro* ont permis de montrer que mTORC2 était capable de phosphoryler deux sérines sur AKT : La sérine 473 et la thréonine 450. La phosphorylation de la sérine 473, motif hydrophobe, par mTORC2 est possible en présence de facteurs de croissance tel que l'insuline qui active le complexe (Frias MA et al, 2006). A l'inverse, la phosphorylation de la Thr-450 par mTORC2 se fait très précocement au cours de la synthèse d'AKT tout en étant insensible aux facteurs de croissance. Cette phosphorylation nécessite une association préalable de mTORC2 et du ribosome (Oh WJ et al, 2010) ; cependant le facteur responsable de cette association n'a pas encore été identifié. Enfin, des travaux suggèrent que les acides aminés et certains nutriments feraient également partie de la cascade de signalisation capable d'induire l'activation de mTORC2 et la phosphorylation d'AKT (Tato et al, 2011). L'insuline est donc un élément important provoquant l'activation de mTORC2 mais d'autres facteurs participant à cette activation sont encore inconnus pour l'instant.

### **5.7.2 Les PKC**

Au niveau de l'activation des PKC, mTORC2 participe à la phosphorylation des sites thréonine 638/641 des PKC $\alpha/\beta$ II, de la thréonine 560 des PKC $\zeta$  (Li X et Gao T, 2013) ainsi que des sérines 657/660 de toutes les PKC conventionnelles et de certaines nouvelles PKC (nPKC) (Ikenoue T et al, 2008). Le complexe mTORC2 contrôle également l'expression des cPKC, cependant le mécanisme reste à préciser. En effet, dans les cellules Sin1<sup>-/-</sup> où l'assemblage de mTORC2 est empêché, la phosphorylation des thréonines 638/641 est réduite parallèlement et la diminution de l'expression des cPKC est inhibée. Or, on sait que la phosphorylation des thréonines 638/641 se déroule habituellement durant la traduction des cPKC. Ainsi, la phosphorylation des PKC contrôlée par mTORC2 des thréonines 638/641 pourraient donc être nécessaires pour garantir la conformation native des cPKC. Néanmoins, il est également possible que mTORC2 contrôle le niveau d'expression des ARNm dont ceux des PKC (Ikenoue T et al, 2008).

### **5.7.3 L'activation de SGK1 par mTORC2 témoigne de l'implication du stress cellulaire dans l'activation du complexe**

Dans les lignées *Sin1<sup>-/-</sup>*, il est également apparu que le complexe mTORC2 était nécessaire pour la phosphorylation et l'activité de la kinase SGK1 impliquée dans le transport du sodium (Garcia-Martinez JM et al, 2008). La kinase SGK1 est connue, comme AKT, pour être stimulée sous l'action de facteurs de croissance mais également en réponse à un stress osmotique, il s'agit donc d'un élément suggérant une contribution des facteurs de stress dans l'activation de mTORC2.

## **5.8 mTOR, entre inflammation et cancer**

### **5.8.1 Généralités sur mTOR et les pathologies inflammatoires**

Etant un contrôleur des processus de croissance et du métabolisme, mTOR est associée à de nombreuses pathologies : les cancers, la neurodégénération, le diabète ou le vieillissement cellulaire. La Rapamycine a été développée à l'origine comme un immunosuppresseur, ce qui indique que mTOR joue un rôle important dans le système immunitaire. La protéine est essentielle pour la survie, la production de cytokines et la migration des neutrophiles (Säemann MD et al, 2009) ou encore des mastocytes (Kim MS et al, 2008). Elle est impliquée dans les fonctions du monocyte et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (Weichhart, Säemann, 2009). Ainsi, dans de nombreuses pathologies inflammatoires, l'activation de mTOR est dérégulée.

L'utilisation de la Rapamycine chez les patients transplantés (rein, foie ou cœur) a été associée à une augmentation de la fréquence d'infections bactériennes telles que des pneumopathies (Weiner SM et al, 2007). A l'inverse, les voies d'activation de mTOR sont suractivées dans les maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé (Fernandez D, Discov Med 2010). Une activation indésirable de mTOR est également observée lors de la pose de stent ; elle est liée à une réaction inflammatoire avec un développement d'affections de resténose causée par une hyperplasie et une réaction immunitaire. De nouvelles générations de stents sont couplées avec de la Rapamycine afin de réduire la cause de la resténose (Morice MC, N Engl J Med 2002).

### **5.8.2 Relations entre mTOR et cancer**

Les voies de signalisation qui débouchent sur l'activation de mTOR sont fréquemment dérégulées durant les tumeurs malignes comme bénignes. En parallèle, plusieurs processus régulés par mTOR participent à la croissance incontrôlée des tumeurs bénignes ou malignes. Ainsi, via S6K et 4E-BP1, mTOR contrôle la prolifération cellulaire et la synthèse de lipides via la synthèse de

SREBP1. Enfin, mTOR régule négativement l'autophagie par lequel le corps limite la croissance des tumeurs. Ces éléments mettent en avant l'importance de mTOR dans la régulation du métabolisme et, par conséquent, l'importance du métabolisme dans les cancers. Les voies de signalisation, permettant l'activation de mTOR sont fréquemment altérées par des mutations dans de nombreux cancers et entraînent la suractivation de la kinase. Cela implique des mutations au niveau de PI3-K, PTEN ou encore AKT. Par exemple, dans les hépatocarcinomes et le cancer du sein PI3KCA, c'est la sous unité catalytique de PI3-K la plus fréquemment mutée (Steelman LS et al, 2011). La littérature ne rapporte que très peu de cas où mTOR est directement mutée durant les cancers. On retrouve une mutation de mTOR dans les adénocarcinomes intestinaux et les carcinomes rénaux (Sato T et al, 2010).

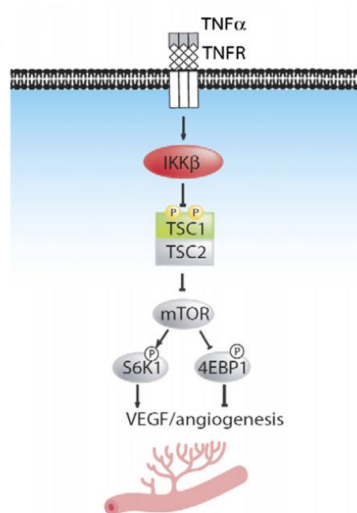
Devant l'importance de mTOR dans le développement des cancers, de nombreuses thérapies basées sur son inhibition ont été testées, mais leur efficacité est restée modeste en comparaison de l'importance de la kinase (Thomas GV et al, 2006). En effet, le blocage de l'activité de mTOR réduirait la croissance cellulaire mais ne serait pas en mesure d'induire la mort des cellules (Menon S, 2008). De plus, un rétrocontrôle mTORC1 induit un rétrocontrôle négatif de mTORC2 : L'activation de mTORC2 entraîne l'activation de mTORC1 mais son substrat S6K1 a en retour la capacité d'inhiber mTORC2 en phosphorylant Sin1 sur les Thr 86 et 298. En bloquant mTORC1, on lèverait donc le rétrocontrôle de l'activité de mTORC2 qu'il réalise, ce qui amplifierait l'activation d'AKT fortement impliquée dans la prolifération des cellules tumorales (Liu P et al, 2013).

### **5.8.3 mTOR est un pont entre inflammation et cancer**

mTOR est donc à la fois impliquée dans l'inflammation mais également les cancers. Ces deux pathologies sont parfois liées puisque l'invasion des tumeurs par les cellules pro-inflammatoires a une influence sur le développement de certains cancers. Cette infiltration est bénéfique dans certaines tumeurs mais elle peut favoriser la progression de certaines autres tumeurs comme lors du cancer du sein (Linnebacher M et al, 2012). En parallèle, de nombreuses maladies inflammatoires chroniques peuvent s'aggraver et donner place à des cancers comme c'est le cas dans les cas graves de cirrhose hépatique alcoolique qui dégénèrent en hépatocarcinome (Ohhira M et al, 1996).

La kinase mTOR joue un rôle important durant la transition entre inflammation et cancer. En effet, dans un modèle d'infiltration tumorale par les macrophages, Chen et al, ont mis en lumière le fait que l'inhibition de mTOR par la Rapamycine diminuait l'angiogénèse et qu'inversement la suractivation de mTOR dans les monocytes augmente l'angiogénèse. La déplétion des monocytes a été suffisante pour bloquer l'effet pro-angiogénique de mTORC1 sur les tumeurs. (Chen W. et al, 2012). Le TNF $\alpha$  joue un rôle central dans cette transition entre inflammation et cancer. Il s'agit d'une

des principales cytokines impliquées dans l'inflammation et produite notamment par les cellules impliquées dans l'inflammation (Macrophages, lymphocytes, cellules NK, neutrophiles, mastocytes...), Lee DF et al., ont montré que suite à l'exposition des lignées cellulaires tumorales MCF-7 et MDA-MB-453 au  $\text{TNF}\alpha$ , la protéine  $\text{IKK}\beta$  a la capacité de se fixer sur TSC1 et réprimer son activité via deux phosphorylations au niveau des Ser-487 et 511, ce qui induit l'activation de mTORC1 (Lee DF et al, 2007). Il existe une association clinique entre l'inhibition de TSC1, l'activité accrue de mTORC1, de  $\text{IKK}\beta$  et le taux de survie de patientes atteintes d'un cancer du sein. Le modèle proposé (Schéma 42) suggère ainsi que suite à l'infiltration d'une lignée tumorale par des cellules myéloïdes, le  $\text{TNF}\alpha$  produit induit la suractivation de mTORC1. La tumeur alors bénigne devient maligne en raison d'un accroissement de la croissance tumorale via une activité pro-angiogénique médiée par S6K1 et 4EBP1 (Lee DF et al, 2007). Les travaux de Chen et al, montrent que STAT3, activé par mTORC1 comme précédemment vu, joue un rôle central dans cette angiogénèse : Son inhibition bloque l'angiogénèse induite par les macrophages (Chen W. et al, 2012).



**Schéma 42 : mTORC1 est au carrefour entre maladies inflammatoires et cancers (Lee DF. et al, Cell 2007)**

La protéine mTOR est donc impliquée à la fois dans la réponse immunitaire mais aussi dans la transition entre inflammation et cancer. L'usage de médicaments pour inhiber mTOR est alors à double tranchant : Diminution de la prolifération cellulaire dans les cancers mais altération des fonctions des cellules immunitaires. Il est donc très important d'étudier et de comprendre tous les effets potentiels qui découlent de l'usage des inhibiteurs de mTOR dans le cadre thérapeutique.

## 5.9 mTOR dans les neutrophiles

L'arrivée de cellules pro-inflammatoires au site infectieux est une étape importante pour l'élimination des agents pathogènes. Plusieurs études ont montré la capacité de la Rapamycine à interférer avec la réponse immunitaire anti-bactérienne. Elle diminue la résistance des souris Balb/c à *Pseudomonas aeruginosa* (Foldenauer ME et al, 2013), augmente la sévérité d'un choc septique lié à l'activation excessive des TLRs ou encore diminue la survie des souris exposées au LPS (Schmitz CJ et al, 2008).

### 5.9.1 La synthèse protéique : Modulation de la réponse inflammatoire

Les neutrophiles matures ont initialement été décrits pour avoir une faible capacité transcriptionnelle, mais de nouvelles fonctions leurs sont constamment découvertes notamment la capacité à synthétiser des protéines spécifiques après une stimulation appropriée. Ces phénomènes de synthèse rapide de protéines se font en réponse à une stimulation des neutrophiles notamment dans un contexte d'inflammation (Scapini P et al, 2000). L'activation de la transcription dans les neutrophiles implique le NF- $\kappa$ B qui transloque depuis le cytoplasme vers le noyau après stimulation des neutrophiles. Le NF- $\kappa$ B lie de nombreux promoteurs et régule la transcription de gènes spécifiques dans un contexte inflammatoire (McDonald PP et al 1997). Ainsi, Lorne et al, montrent que la production d'anion superoxyde via l'interaction directe de la xanthine oxydase avec le TLR4 induit une augmentation de l'activation du NF- $\kappa$ B. Il en résulte une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  ou MIP-2 (Lorne E et al, 2008). La Rapamycine est en outre en mesure de bloquer la synthèse d'IL6 et de TNF par les neutrophiles stimulés par le LPS, agoniste du TLR4 (Lorne E. et al, 2009). Schmitz et al (Schmitz CJ et al, 2008) décrivent un nouveau mécanisme où mTOR est physiquement associé à l'adaptateur MyD88 en aval de nombreux TLR et entraîne l'activation des facteurs de transcription IRF-5 et IRF-7. Ces facteurs contrôlent respectivement l'activation des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et l'IFN- $\alpha$ .

Le neutrophile a également la capacité de stocker des ARNm précédemment transcrits afin d'initier une traduction rapide après leur activation lors d'une inflammation. On peut citer l'exemple de la traduction de l'IL6R du neutrophile, qui est induite par PAF de manière sensible à la Rapamycine mais pas aux inhibiteurs de la transcription (Lindemann SW et al, 2004). Yost CC et al ont également pu mettre en évidence que le neutrophile était capable d'induire une traduction rapide de l'ARNm du récepteur de l'acide rétinoïque suite à la stimulation des cellules par PAF. Cette traduction est contrôlée par la protéine mTOR comme le démontrent leurs expériences basées sur la Rapamycine et l'inhibiteur de la traduction cycloheximide (Yost CC et al, 2004). Ce récepteur de l'acide rétinoïque est en outre capable de moduler le niveau de transcription en se liant à des régions

promotrices de gènes et portant la séquence RARE (Retinoic acid response elements). Le gène codant pour l'IL8 est une de ses cibles (Yost CC et al, 2004).

### 5.9.2 mTOR et NADPH oxydase

Plusieurs éléments attestent que les FRO peuvent agir comme des seconds messagers dans la signalisation intracellulaire en fonction de la concentration, du temps auquel la cellule y est exposée et le type cellulaire considéré. Les réponses à cette exposition sont variées pouvant aller d'un impact sur la prolifération ou croissance cellulaire jusqu'à la nécrose. Plusieurs travaux ont déjà mis en évidence le fait que ces FRO seraient capables de moduler l'état d'activation de mTORC1 sans pour autant clairement définir s'ils entraînent l'activation ou l'inhibition du complexe.

Li M. et al, ont pu suggérer, dans les lignées MEF, qu'une exposition brève à de faibles concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était capable d'induire l'activation de mTORC1 via l'activation de la PI-3K, AKT, PLD1 et de manière indépendante de TSC2. Ils ont ensuite montré qu'un traitement à de fortes concentrations inhibe l'activité de mTORC1 via l'activation de la phosphatase 2A et l'AMPK (Li M et al, 2010). Ces résultats peuvent ainsi suggérer que les FRO produits par la NOX2 des neutrophiles pourraient moduler l'activation de mTOR des cellules avoisinantes PN inclus : Au site d'inflammation, les fortes concentrations de FRO produites par les PN pourraient inhiber mTORC1 des cellules exposées non tuées tandis qu'à distance du site d'inflammation la diminution de la concentration des FRO du fait de leur diffusion activerait à l'inverse la protéine mTOR des cellules exposées à distance. Ainsi, des travaux ont pu mettre en évidence que l'effet de la Rapamycine était diminué en présence de FRO (Neklesa TK, PNAS 2008). Bien que peu d'études n'ont permis d'identifier un lien direct entre les FRO produites par la NOX2 du neutrophile et mTOR, les travaux de Cavaliere F, et al réalisés dans les oligodendrocytes proposent un modèle où les FRO produites par la NOX2 exprimée par ces cellules neuronales entraîneraient l'activation de mTORC1 via l'activation de l'axe PI-3K/AKT et ERK1/2 (Cavaliere F et al, 2013). Les travaux de Nayak BK, proposent quant à eux le fait que les FRO produits par les NADPH oxydases dépendantes de p22<sup>phox</sup> (NOX1, 2, 3, 4) permettent de stabiliser le complexe mTORC2. Ceci a pour conséquence de promouvoir les fonctions associées à mTORC2 comme l'activation de mTORC1 et donc d'induire la traduction de nombreux gènes tels que HIF1 $\alpha$  (Nayak BK et al, 2013).

La kinase mTOR est en outre impliquée dans la phosphorylation de nombreux effecteurs et contrôle la synthèse de nombreuses protéines. Bien qu'aucun élément ne suggère jusque-là que la kinase pourrait participer à l'activation de NOX2 du neutrophile, des travaux ont mis en évidence un rôle important de la kinase dans d'autres isoformes tels que NOX4 au niveau des podocytes : L'activation de mTORC1 entraîne l'augmentation l'expression des NOX4 et la production de FRO

(Eid AA et al, 2013). On serait donc en présence d'une boucle d'amplification où mTORC1 serait capable d'augmenter la production de FRO des NADPH oxydases et pourrait être activé par les FRO de ces mêmes NADPH oxydases.

### **5.9.3 Chimiotactisme**

Le chimiotactisme du neutrophile est une fonction détaillée dans le chapitre 1. Cependant, l'implication de mTORC1 et mTORC2 dans cette fonction essentielle des neutrophiles dépend du stimulant. En effet, Gomez-Cambronero et al, ont pu montrer que de faibles concentrations de Rapamycine de l'ordre du nanomolaire sont capables d'inhiber ce chimiotactisme des neutrophiles induit par le GM-CSF et l'IL8 en inhibant le remodelage du réseau d'actine induit par le GM-CSF. Le FK506, qui neutralise l'effet de la Rapamycine en rentrant en compétition avec FKBP12, neutralise l'effet inhibant de la Rapamycine sur le chimiotactisme du PN induit par le GM-CSF (Gomez-Cambronero J, 2003). A l'inverse, Liu et al, montrent que mTORC1 ne régulerait pas le chimiotactisme des PN induit par le fMLP. L'implication de mTORC2 a pu être identifiée sur la base de la déplétion de RICTOR dans les lignées PLB-985 (Liu L et al, 2010). Le complexe mTORC2 s'est également montré capable de réguler la myosine via l'activation de l'adenylyl cyclase 9 et l'AMPc consécutive à l'activation des cPKC (Liu L et al, 2010).

### **5.9.4 La phagocytose**

La phagocytose est un processus par lequel les cellules immunitaires, principalement neutrophiles et macrophages, englobent des particules solides pour former le phagosome afin de procéder à leur élimination. Malgré le fait la phagocytose requiert la polymérisation de l'actine qui elle-même fait participer mTOR, aucun élément dans la littérature n'atteste jusque-là d'une relation entre mTOR et les étapes précoces de la phagocytose. Néanmoins, concernant l'étape finale de la phagocytose qui consiste à la fission du phagosome et la libération de son contenu digéré, Krajcovic et al, un ralentissement de cette étape suite à l'inhibition pharmacologique de l'activité de mTOR ainsi que sa déplétion par siRNA ou shRNA (Krajcovic M et al, 2013).

### **5.9.5 L'autophagie dans les neutrophiles**

L'autophagie a été récemment décrite comme un nouveau mécanisme antimicrobien du neutrophile (Jones SA et al, 2013). Les pathogènes y sont dégradés par la machinerie lysosomiale. L'inhibition de mTOR par la Rapamycine permet d'induire l'autophagie.

Les neutrophiles infectés contiennent de multiples corps vésiculaires qui sont formés par les voies de l'autophagie et sont capables de fusionner avec les phagosomes contenant les pathogènes (Griffiths G et Mayorga L, 2007). L'autophagie est un processus sensible aux bactéries ou aux toxines. En effet, le LPS est capable d'induire l'autophagie dans les macrophages et d'augmenter la



localisation des mycobacterium dans l'autophagosome via l'activation du TLR4 (Xu Y et al, 2007). Les pathogènes phagocytés sont parfois capables de sortir du phagosome et de se retrouver dans le cytoplasme. Ils peuvent alors être ubiquitinés et reconnus par la machinerie dite « xenophagy » c'est à dire une autophagie des pathogènes intracellulaires au travers du recrutement de la p62 (aussi nommée SQSTM1) et de LC3 (Nakagawa I et al, 2009).

De récentes études ont révélé que l'activité autophagique était nécessaire pour le piégeage extracellulaire des pathogènes (NET). En effet, Remijnsen et al, ont montré que l'inhibition de l'autophagie empêchait la formation des NET par les PN et les entraînait vers les voies d'apoptose (Remijnsen Q et al, 2011). En accord avec cela, Asako I et McCarty OJT décrivent que l'inhibition de mTOR par la Rapamycine contribue à la génération de la NETose induite par fMLP dans le PN via l'activation de l'autophagie (Itakura A. et McCarty OJ, 2013). Cependant, peu d'éléments sont connus quant au mécanisme par lequel l'autophagie participe aux NETs. Néanmoins, les travaux Alison MM. et collaborateurs contredisent cela et montrent que l'inhibition de mTOR par la Rapamycine ainsi que la Torin 1 réduit la formation de NET des neutrophiles. Ils suggèrent alors que mTOR a la capacité d'activer les NET de manière indépendante de l'autophagie mais plutôt via l'augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  (Alison MM. et al, 2012).

### **5.9.6 La dégranulation**

Bien que le fait que mTOR soit impliqué dans le remodelage du réseau d'actine, actuellement, il n'y a pas de preuve d'une implication de mTOR dans les processus de dégranulation du neutrophile. D'autres cellules telles que les mastocytes sont également capables de dégranuler leur contenu selon des mécanismes similaires à ceux présents dans les neutrophiles. Cependant Kim et al, ont pu montrer que l'utilisation de la Rapamycine n'affecte pas la dégranulation des mastocytes induite par la stimulation du récepteur FC $\epsilon$ RI (Kim MS, J Immunol 2008).

## **5.10 mTOR : Une cible thérapeutique**

Les deux complexes mTORC1 et mTORC2 régulent de très larges fonctions cellulaires. De ce fait, l'inhibition de mTOR permet de cibler des fonctions cellulaires dérégulées dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, le diabète et les désordres liés à l'âge.

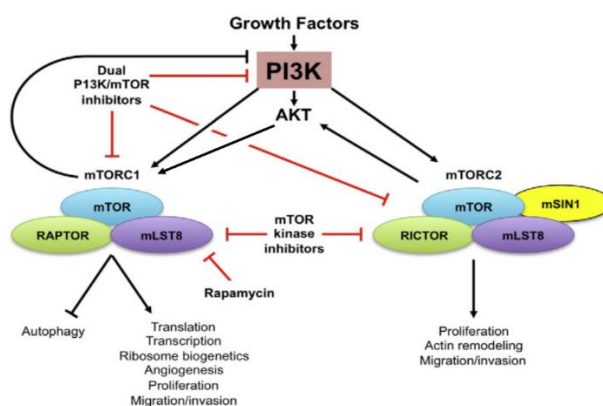


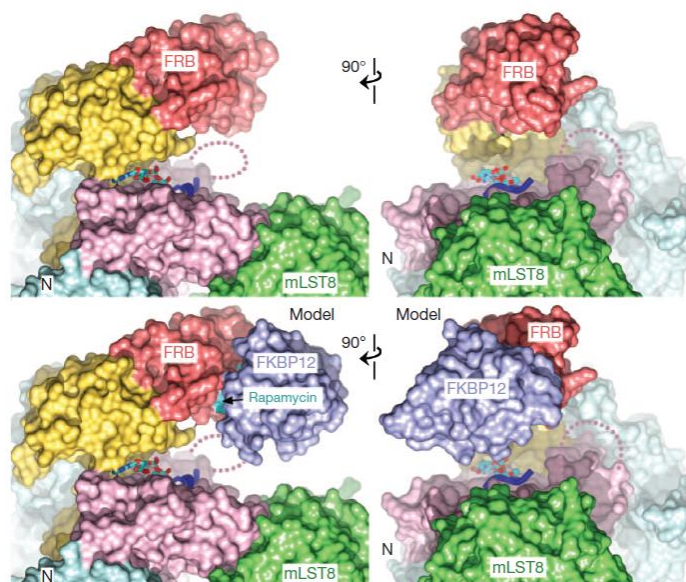
Schéma 43 : Les stratégies d'inhibition des fonctions cellulaires associées à mTOR (schéma adapté de Zytseva YY., et al, Cancer Lett. 2012)

### 5.10.1 La Rapamycine

La Rapamycine, également nommée Sirolimus, est une molécule isolée en 1975 d'une bactérie filamenteuse *Streptomyces hygroscopicus* présente dans le sol de l'île de Pâques et connue sous le nom de Rapa nui d'où son nom. Initialement considérée comme antibiotique, elle a ensuite été utilisée pour ses propriétés immunosuppressives, anti-inflammatoires et anti prolifératrices. En clinique, la molécule est utilisée pour prévenir le rejet de greffe, en particulier du rein, en inhibant l'activation des lymphocytes B et T normalement médiée par l'interleukine 2. Plus récemment, ses propriétés anti-prolifératives ont été utilisées et combinées à des agents de revêtement des stents afin d'éviter la resténose, c'est-à-dire le rétrécissement de la lumière de l'artère par prolifération des cellules musculaires lisses autour d'un stent.

Le mode d'action de la Rapamycine implique préférentiellement l'inhibition de mTORC1 en empêchant l'accès des substrats au site catalytique de mTOR selon deux modes d'action. Dans un premier temps dans des modèles de cristallisation de mTOR-mLST8, la Rapamycine s'associe à FKBP12 et tous deux s'associent au domaine FRB réduisant ainsi l'ouverture de la poche catalytique de mTOR à 8 Å (Schéma 44) (Yang H et al, 2013). Ce rétrécissement réduit donc l'accessibilité du site catalytique pour les gros substrats de mTOR telle que S6K1.

Yip CK. et al, montrent également que la dimérisation de mTORC1, nécessaire à son activité, est perturbée par un traitement prolongé. La Rapamycine induit un changement conformationnel de mTOR qui altère sa liaison avec RAPTOR et déstabilise le complexe mTORC1 : La phosphorylation de 4E-BP1 est à son tour empêchée (Yip CK et al, 2010).



**Schéma 44 : Le site kinase de mTOR obstrué par Rapamycine-FKBP12 (Yang H. and al, Nature 2013)**

Le complexe mTORC2 est normalement insensible aux traitements aigües des cellules par la Rapamycine puisque RICTOR utilise le domaine FRB pour se fixer à mTOR et empêche alors la Rapamycine d'y avoir accès. Cependant, lorsque la Rapamycine inhibe mTORC1 ou mTOR libre, elle se fixe sur le domaine FRB, séquestre la protéine et empêche donc à terme la protéine mTOR néoformée de s'insérer dans le complexe mTORC2 (Sarbasov DD et al, 2006). Ainsi, sur des lignées HEK-293T et Hela traitées durant 24h par la Rapamycine, l'interaction entre mTOR et mSIN1 est empêchée (Frias MA et al, 2006) et la phosphorylation de la S2481 de mTOR est diminuée (Copp J et al, 2009). Ainsi, des concentrations de Rapamycine comprises de 10 à 100 nM durant 2H sont capables de bloquer mTORC1 (Laplante et al, 2012) tandis qu'il est nécessaire d'augmenter cette concentration à 1  $\mu$ M durant 24H afin d'avoir le même effet pour mTORC2 (Sarbasov DD et al, 2006).

La Rapamycine a donc souvent été utilisée comme inhibiteur de mTORC1, cependant certaines fonctions associées au complexe ne sont pas totalement bloquées par la Rapamycine. Dans les cellules fibroblastiques embryonnaires de souris (MEF), la Rapamycine inhibe plus faiblement les phosphorylations de 4E-BP1 que la Torin1 (Thoreen CC et al, 2009). De même, l'induction de l'autophagie par l'inhibition de mTORC1 grâce à la Rapamycine est très faible, or l'usage de la Torin2, autre inhibiteur de mTOR, active plus puissamment cette autophagie. De la même manière, ces résistances sont en partie causées par l'acide phosphatidique généré par la phospholipase D (PLD) qui entre en compétition avec la rapamycine-FKBP12 pour la liaison de FRB (Fang Y et al, 2001).

### 5.10.2 Les autres inhibiteurs de 1<sup>ère</sup> génération : Les rapalogues

Alors que la Rapamycine est utilisée généralement dans la prévention des rejets de greffes et pour lutter contre la resténose, ce sont les nombreuses découvertes concernant l'implication de mTOR dans les cancers qui ont motivé la volonté de synthétiser ces inhibiteurs spécifiques de mTOR. Les rapalogues sont des analogues semi synthétiques de la Rapamycine qui adoptent la même structure globale avec des ajouts moléculaires au niveau du carbone 43 afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques (Schéma 45).

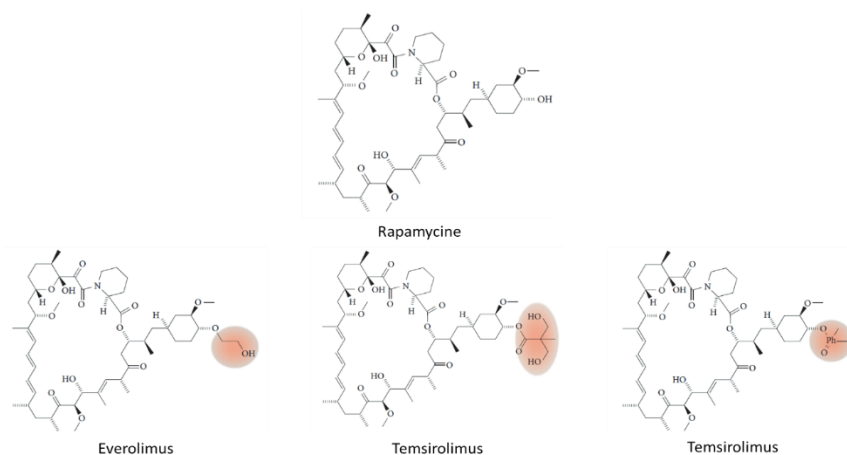


Schéma 45 : Les différents rapalogues (Illustration adaptée de Benjamin et al., Nature Reviews Drug discovery 2011)

#### a) Everolimus (nommé RAD001)

Il s'agit d'un dérivé éther développé pour des administrations orales. Il est utilisé dans le cadre de la prévention du rejet d'allogreffes mais également lors de la lutte contre les cancers avancés du rein (2009), des tumeurs associées à la sclérose tubéreuse de Bourneville et des tumeurs neuroendocriniennes. Une étude a pu montrer que l'utilisation d'Everolimus sur des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde réduit la différenciation et l'activité des ostéoclastes, augmente leur apoptose et améliore modestement l'état des patients (Bruyn GAW et al, 2008).

#### b) Temsirolimus

Egalement nommé CCI779 dérive de la Rapamycine par l'ajout d'un groupement ester. Il est hydrophile ce qui lui permet d'être administré par voie orale ou intraveineuse. Ce médicament est utilisé dans la lutte contre le cancer du rein (2007) et les lymphomes du manteau.

#### c) Deforolimus

Deforolimus comporte également une modification sur le carbone 43 par l'ajout d'un groupement phosphate afin d'améliorer sa solubilité dans l'eau et donc son administration par voie orale. En 2011 cette molécule a passé avec succès les tests de phase III sur des patients atteints de sarcomes mais n'est pas encore sur le marché.

d) Zotarolimus et umirolimus

Il s'agit également des rapalogues mais utilisés uniquement dans la prévention de la resténose.

### 5.10.3 Les inhibiteurs compétiteurs de l'ATP

Les inhibiteurs de seconde génération de mTOR sont des compétiteurs de l'ATP de mTOR. De ce fait ils, inhibent efficacement à la fois mTORC1 et mTORC2 contrairement aux rapalogues et ont donc un pouvoir inhibant de mTORC1 accru par rapport aux rapalogues. Leur potentiel anticancéreux étant augmenté, plusieurs de ces inhibiteurs sont entrés en phase de tests cliniques :

Classes	Drugs	mTOR ( <i>in vitro</i> kinase IC50)	mTORC1 (cellular potency EC50)	mTORC2 (cellular potency EC50)	Class I PI3K ( <i>in vitro</i> kinase IC50)
ATP-competitive mTOR inhibitors ( <i>first generation</i> )	KU-0063794	2.5 nM <sup>1</sup>	660 nM <sup>3</sup>	240 nM <sup>3</sup>	>5.3–>30 µM
	PP242 <sup>4</sup>	8 nM		300–400 nM	0.10–2.2 µM
	PP30 <sup>4</sup>	80 nM			0.68–5.8 µM
	Torin 1 <sup>4</sup>	4.3 nM	2–10 nM	2–10 nM	0.17–>10 µM
	WEY-600 <sup>4</sup>	9 nM <sup>1</sup>	300 nM	1 µM	1.96–8.45 µM
	WYE-354 <sup>4</sup>	5 nM <sup>1</sup>	300 nM	1 µM	1.89–7.37 µM
	CC214-1	2 nM	40 nM	18 nM	1.38 µM
	OSI-027 <sup>4</sup>	4 nM			0.42–>30 µM
ATP-competitive mTOR inhibitors ( <i>second generation</i> )	X-387 <sup>4</sup>	23 nM <sup>1</sup>			0.12–>0.3 µM
	AZ8055	0.13 nM <sup>1</sup>	27 nM <sup>3</sup>	24 nM <sup>3</sup>	3.2–18.9 µM
	AZ2014	2.8 nM <sup>1</sup>	200 nM <sup>3</sup>	80 nM <sup>3</sup>	3.8–>30 µM
	INK128/MLN0128 <sup>4</sup>	1 nM	<10 nM	<10 nM	0.22–5.29 µM
	WYE-125132	0.19 nM <sup>1</sup>	20 nM	200 nM	1.18–>10 µM
	CC214-2	106 nM	386 nM	315 nM	>30 µM

Tableau 8 : Les inhibiteurs de mTOR de seconde génération (Adapté à partir de Lisi L et al, Biomed Res Int 2015)

Afin de renforcer leurs effets, ces inhibiteurs compétiteurs de l'ATP ciblent également d'autres points des voies de signalisation en amont de mTOR. C'est le cas par exemple pour les inhibiteurs mTOR/PI3K. La PI3K est centrale pour de nombreuses fonctions biologiques, dans le neutrophile par exemple, elle participe à la transduction du signal issu du récepteur fPR en vue d'activer la NADPH oxydase. Ceci suggère donc que cette famille d'inhibiteur pourrait ne pas être restreint uniquement au domaine des tumeurs mais également s'élargir aux fonctions biologiques faisant appel à l'axe PI3K/AKT et dérégulées, notamment la production incontrôlée de formes réactives de l'oxygène par le neutrophile, comme c'est le cas dans la polyarthrite rhumatoïde.

Classes	Drugs	mTOR ( <i>in vitro</i> kinase IC50)	mTORC1 (cellular potency EC50)	mTORC2 (cellular potency EC50)	Class I PI3K ( <i>in vitro</i> kinase IC50)
ATP-competitive mTOR/PI3K dual inhibitors	Wortmannin	0.2 $\mu$ M <sup>1</sup>			0.1 nM
	LY294002/SF1101 <sup>5</sup>	1.5 $\mu$ M <sup>1</sup>			0.5–1.6 $\mu$ M
	PI-103 <sup>5</sup>		<i>In vitro</i> kinase IC50: 20 nM	<i>In vitro</i> kinase IC50: 83 nM	2–15 nM
	Torin 2	2.81 nM	0.25 nM	10 nM	4.68–17.5 nM
	GSK2126458	ND	Low nM	0.18–0.41 nM	0.04 nM
	NVP-BEZ235 <sup>5</sup>	20.7 nM	<250 nM	8 nM	4–75 nM
	NVP-BGT226 <sup>6</sup>				4–63 nM
	SF1126 (RDGS conjugated SF1101)				Not significant inhibitory activity until hydrolyzed to SF1101
	PKI587	1.4 nM <sup>1</sup>	<30 nM	<10 nM	0.6–8 nM

**Tableau 9 : Les inhibiteurs PI3K/mTOR (Adapté à partir de Lisi L et al, Biomed Res Int 2015)**

Plusieurs tests cliniques sont en cours et les plus avancés (Phase II) concernent tous des traitements pour des tumeurs solides. On retrouve le NVP-BEZ235 de Novartis, le XL765 de Sanofi-Aventis, le BGT226 de Novartis et le PF-04691502 de Pfizer. Cependant, le fait que l'axe PI3K/AKT concerne de larges fonctions biologiques, peut soulever des questions quant à la toxicité de tels traitements.

#### **5.10.4 Bénéfices des inhibiteurs de mTOR dans les pathologies : Actualité et perspectives**

Les voies de signalisation en amont ou aval de mTOR sont dérégulées dans de nombreuses maladies, incluant le cancer, l'obésité, le diabète de type 2 et la neurodégénération. L'inhibition de mTOR a donc été une stratégie rapidement employée dans un cadre thérapeutique.

C'est en 2007 que la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé le rapalogue Temsirolimus comme traitement des carcinomes rénaux avancés, faisant ainsi du Temsirolimus le premier inhibiteur de mTOR approuvé dans le traitement des cancers. Ainsi plus largement les premiers inhibiteurs de mTORC1 ont fréquemment été dédiés à la lutte contre les cancers. Everolimus a été approuvé pour le traitement d'une maladie génétique rare affectant le complexe TSC1/2 et dans laquelle les patients développent des tumeurs dans de nombreux organes. Cependant, les rapalogues n'ont qu'une efficacité modeste au niveau des tumeurs qu'elles étaient censées combattre efficacement (Thomas GV et al, 2006). Ainsi, les inhibiteurs de seconde génération, en particulier ceux ciblant à la fois mTOR et la PI3K, sont rentrés en essais cliniques et ont montré une efficacité prometteuse dans de nombreux types de cancers (Revue de Vilar E et al, 2011). L'utilisation de la Rapamycine comme traitement de l'obésité et de l'hyperactivation du métabolisme associé a été envisagée puisque chez les patients traités de manière chronique par la Rapamycine, des réductions d'activités métaboliques ont été observées (Stallone G et al, 2009). Dans ce contexte, la Metformin, un médicament antidiabétique, améliore l'activité métabolique des patients en inhibant partiellement l'activité de mTORC1.

La kinase mTOR est également impliquée dans la régulation du développement cardiovasculaire de l'embryon (Zhu Y et al, 2013). L'inhibition de mTOR bloque la migration et la prolifération des cellules des muscles lisses. Cette prolifération est l'un des principaux effets secondaires lors du traitement des maladies coronariennes par la pose d'un stent. En effet, la prolifération des cellules à l'intérieur du stent occasionne fréquemment l'occlusion du vaisseau sanguin (la resténose). L'association des Rapalogues avec les agents de revêtement des stents permet de limiter cette prolifération cellulaire et s'avère efficace afin de prévenir les resténose lors de la pose des stents (Marx SO et al, 1995). La mortalité due aux maladies cardiovasculaires est 2 à 4 fois plus élevée chez les patients diabétiques par rapport aux non diabétiques (Roger VL et al, 2012), ainsi les Rapalogues offrent des possibilités de traitement durant les complications liées au diabète. Enfin, concernant les maladies neurodégénératives comme Parkinson, Alzheimer ou Huntington, des facteurs génétiques et liés à l'âge prédisposent à la survenue des ces maladies. Beaucoup d'éléments suggèrent que les voies de dégradation intracellulaire des protéines via l'autophagie et le protéasome seraient dérégulées (Rubinsztein DC, 2006). Parce que les voies de signalisation contrôlées par mTOR sont les plus importants régulateurs de l'autophagie, leur implication dans les maladies dégénératives a depuis longtemps fait l'objet d'investigations. Dans ce contexte, l'émergence de nouvelles générations d'inhibiteurs de mTOR pourrait donc permettre de clarifier le rôle de la kinase dans ces maladies dégénératives et ouvrir la voie à de nouvelles thérapies.

# **6 - Neutrophiles, cirrhose hépatique alcoolique et maladies infectieuses**

## **6.1 Introduction**

Les neutrophiles constituent la plus grande famille de leucocytes circulants et sont les premières cellules à migrer du sang vers les foyers inflammatoires. Cependant, lorsque les processus inflammatoires sont dérégulés, une activation excessive ou inappropriée des neutrophiles peut se produire, et les neutrophiles vont continuer à libérer leur contenu toxique et produire des FRO en grande quantité ou dans un endroit non approprié. Cela va contribuer aux dommages tissulaires et à l'entretien de l'inflammation comme c'est de cas dans l'arthrite rhumatoïde.

Dans d'autres pathologies comme la cirrhose hépatique, qui fait l'objet d'une partie de notre étude expérimentale, la perception du PN comme un élément d'agression systématique du foie commence à être remis en cause dans certains travaux récents. Compte tenu du rôle central des neutrophiles dans l'inflammation et les pathologies infectieuses, nous consacrerons ce chapitre sur les pathologies ayant le plus d'importance au regard de notre étude : la cirrhose hépatique alcoolique et le sepsis. Nous examinerons également l'implication du neutrophile dans certaines maladies pulmonaires dont certaines atteintes fibrotiques partagent des caractéristiques avec la fibrose hépatique, où les fonctions des neutrophiles sont bien caractérisées et où des approches thérapeutiques innovantes ont été élaborées et pourraient être utilisées dans d'autres pathologies inflammatoires.

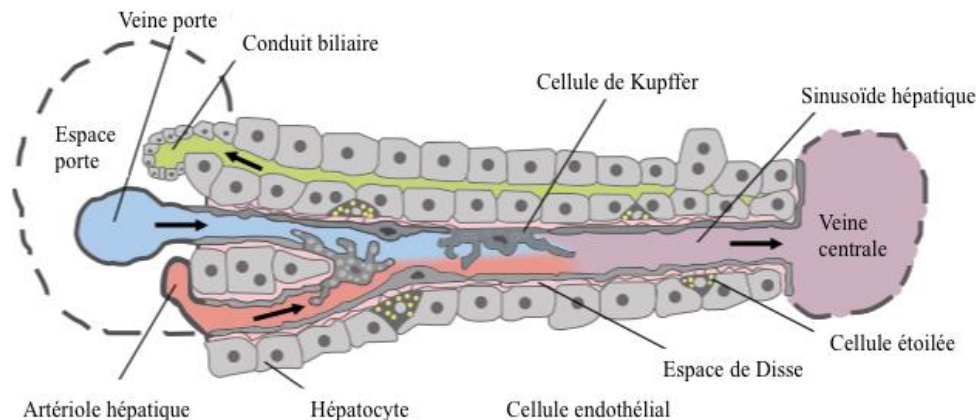
## **6.2 Généralités sur le foie**

### **6.2.1 Le foie sain**

Le foie est un organe vital assurant une large variété de fonctions essentielles pour l'organisme : Détoxification de métabolites, synthèse d'hormones, de protéines, enzymes nécessaires pour la digestion. Le Schéma 46 illustre la composition cellulaire d'une sinusioïde hépatique. La grande majorité du foie est composée d'hépatocytes (70-85% de la masse du foie), il s'agit de cellules parenchymateuses impliquées dans les principales fonctions de l'organe précédemment citées. Le reste des cellules est constitué majoritairement de cellules non parenchymateuses se trouvant au sein des capillaires sanguins : les cellules endothéliales sinusoidales qui tapissent les capillaires sanguins



et les cellules de Kupffer qui sont les macrophages résidant dans le foie. Les cellules étoilées du foie ne se trouvent pas dans le capillaire sanguin mais dans l'espace de Disse séparant l'endothélium des hépatocytes. Dans le foie sain la fonction de ces cellules n'est pas clairement établie. Cependant, ces cellules jouent un rôle central dans les processus de fibrose hépatique. Elles deviennent actives lorsque le foie est endommagé et présentent une intense activité proliférative, un chimiotactisme et ont la capacité de sécréter le collagène qui peut contribuer au développement de la cirrhose (Li JT et al, 2008).



**Schéma 46 : Architecture d'une sinusoiïde hépatique (Adapté de Frevert et al, 2005)**

Le foie est stratégiquement placé entre les intestins et le reste de la circulation sanguine. Il est connecté à la circulation sanguine via deux larges vaisseaux sanguins : l'artère hépatique qui apporte le sang riche en oxygène et la veine porte qui est directement connectée à l'appareil digestif et riche en nutriment. Cette place dans l'organisme fait qu'il est continuellement exposé aux produits bactériens, toxines et antigènes dérivés des aliments. Ainsi, les neutrophiles jouent un rôle important dans le système de défense du foie. Au niveau du foie, les vaisseaux sanguins se subdivisent en petits capillaires connus sous le nom de sinus hépatiques et qui ont la capacité de recueillir à la fois le sang de l'artère et de la veine porte. Le Schéma 46 représente la structure des sinus hépatiques.

Le foie est un organe doué d'une capacité de régénération suite à un endommagement. Il s'agit d'un processus finement régulé où l'hormone de croissance HGF (Hepatocyte growth factor) joue un rôle central en déclenchant la prolifération des hépatocytes qui seront les principaux acteurs de la régénération complète du foie (Michalopoulos G et al, 1984). D'autres cytokines sont impliquées dans ce phénomène : Les  $\text{TNF}\alpha$  et l'IL-6 sécrétés par les cellules de Kupffer jouent respectivement un rôle dans la prolifération des hépatocytes et la synthèse protéique (Revue Michalopoulos GK et DeFrances MC, 1997). Ainsi, à partir d'une ablation des 2/3 du foie, l'organe a la capacité de retrouver sa masse initiale en deux semaines (Michalopoulos GK et DeFrances MC, 1997).

## **6.2.2 La fibrose hépatique**

Lorsque des lésions du foie affectent la matrice extracellulaire ou les tissus conjonctifs principalement composés de collagène, alors l'organe perd ses capacités uniques de régénération. La réparation des tissus engendre la mise en place de cicatrises caractéristiques de fibroses hépatiques (Friedman SL et al, 2000). Une dégradation de la matrice extracellulaire peut survenir au travers de l'action d'enzymes : MMP2 et MMP9 qui dégradent le collagène de type IV (Veidal SS et al, 2011) et la stromelysine 1 qui dégrade les protéoglycanes et glycoprotéines de la matrice. L'activation des cellules étoilées hépatiques consécutive à la dégradation de la matrice extracellulaire normale est source majeure de MMP2 (Arthur MJ et al, 1992) et est également à l'origine de ces dépôts de collagènes et la fibrose. Les cellules étoilées induisent une production de nouvelle matrice extracellulaire principalement composée de collagène de type I normalement présent au niveau des tissus cicatriciels en remplacement du collagène de type IV, principal composant de la lame basale (Masuzaki R et al, 2013). De ce fait, lors d'une fibrose avancée, le foie peut contenir jusqu'à 6 fois plus de matrice extracellulaire (Arthur MJ et al, 2000).

La fibrose en elle-même ne cause pas de symptôme clinique, la plupart de ceux observés sont causés par le désordre qui a engendré cette fibrose. La progression de la fibrose hépatique suite à la répétition des dommages peut entraîner cependant le développement d'une cirrhose hépatique.

## **6.3 La cirrhose hépatique**

### **6.3.1 Définition**

La cirrhose est une cause de mortalité en croissance dans le monde, responsable de 3,8% des décès (Blachier M et al, 2013 ; Moreau et Rautou, 2014). Il s'agit d'un remodelage irréversible de l'architecture du foie associé à une détérioration des fonctions de l'organe. Sur le plan histologique, la cirrhose hépatique est caractérisée par des nodules de régénération. Il s'agit d'îlots d'hépatocytes mitotiques délimités par un réseau fibrogénique dense (International working party, 1995) qui sont bénins mais peuvent devenir malins et être impliqués dans les hépatocarcinomes. Durant la cirrhose, on assiste à une profonde désorganisation de l'architecture vasculaire et une perte de fonction du foie. Au niveau clinique, la cirrhose est perçue comme le stade terminal d'une affection du foie dont les atteintes les plus graves conduisent invariablement à la mort du patient à moins qu'une transplantation du foie ne soit effectuée. La mortalité à 1 an associée à la cirrhose hépatique varie fortement puisqu'elle est comprise entre 1% et 57%. Elle dépend de l'apparition clinique de forme dite décompensée, c'est-à-dire liée à la survenue de complications et de défaillances d'autres organes

(D'Amico G et al, 2006). On retrouve alors des ascites, sepsis ou encore une encéphalopathie. La cirrhose est classifiée selon 4 stades voire 5 ;

Stade	Complications	Mortalité à 1 an
Stade 1	Forme compensée sans varice	1%
Stade 2	Forme compensée avec varices oesophagiennes	3 - 4%
Stade 3	Forme décompensée avec apparition d'ascites	20%
Stade 4	Forme décompensée avec ascites et saignements intestinaux	57%
Stade 5	Forme décompensée avec infections et défaillance rénale	70%

Tableau 10 : Evolution de la cirrhose hépatique (d'après d'Amigo G et al, 2006)

Afin d'évaluer le développement de la cirrhose hépatiques, différents critères biologiques sont utilisés afin d'établir des scores d'avancée de la pathologie. Le score Child-Pugh est utilisé afin de quantifier l'avancée des maladies chroniques du foie et en particulier la cirrhose. Il repose sur les mesures des concentrations sanguines de bilirubine, sérum albumine et il prend également en compte le taux de prothrombine (évaluation de la coagulation du sang), le développement d'ascites et d'encéphalopathies. A partir de ces critères, un score est établi et divisé selon trois groupes : **(A) pour les scores compris entre 5-6** désigne les patients ayant 100% de chances de survie à un an, **(B) 7-9** rassemble les patients ayant 80% de chances de survie à un an, et enfin **(C) au-delà de 10** désigne généralement les patients qui ont développé des formes décompensées de la cirrhose (bien que pouvant s'observer dès le stade B) et ayant un pronostic vital réduit à 45% à 1 an. (Cholongitas E et al, 2005).

Le score MELD (pour « **M**odel for **E**nd-stage **L**iver **D**isease ») est aussi utilisé et permet de définir le taux de survie des patients en stade sévère de maladie du foie. Il a été à l'origine mis en place pour évaluer la survie à 3 mois de ces patients devant recevoir une transplantation du foie. Il utilise le taux de bilirubine, la créatinine, et la prothrombine afin de calculer un score allant de 1 à 40. Le taux 40 désigne les patients qui ont plus de 70% de risque de mourir dans les 3 mois, de 30 à 39% ceux ayant plus de 50%, de 20 à 29 ceux ayant prêt de 20%, de 10 à 19 ceux ayant 6% et enfin moins de 2% de risque de mourir à 3 mois pour les taux inférieurs à 9 (Wiesner R et al, 2003)

### 6.3.2 Physiopathologie de la cirrhose hépatique

Au niveau physiopathologique, en réponse à des dommages (alcool, hépatite virale) des régulateurs de croissances (EGF, TGF- $\alpha$  etc.) induisent une croissance artérielle (angiogénèse) et l'hyperplasie des hépatocytes sous forme de nodules de régénération. L'angiogénèse de nouveaux vaisseaux sanguins se produit dans la région fibrotique qui entoure les nodules de régénération.

La cirrhose hépatique est caractérisée par une profonde modification de la dynamique des fluides sanguins dans l'organisme. En effet, la désorganisation de l'architecture du foie durant la fibrose puis la cirrhose hépatique se traduit par une revascularisation anarchique de l'organe où le

transit du sang y est altéré. De plus, les cellules étoilées activées du foie entraînent la génération de collagène qui vient se déposer dans l'espace péricapillaire (Pinzani M, 1995). Les cellules de Kupffer, produisent des cytokines telles que le TNF ou d'endothéline (ET-1) (Gabriel A et al, 1998). Cette dernière, l'ET-1, entraîne la contraction des cellules étoilées et des sinusoides hépatiques ralentissant le flux sanguin dans le foie créant alors un bouchon (Bosch J et al, 2008). Une réduction du drainage de la veine porte est alors observée avec une élévation de la pression sanguine. Ce nouvel état entraîne des complications majeures systémiques qui participent à des dysfonctionnements rénaux, cardiaques et du système endocrinien (Figueiredo A et al, 2012). Ainsi, au niveau de l'appareil digestif l'hypertension portale se répercute au niveau des capillaires sanguins intestinaux affluant et augmente la pression hydrostatique. Ceci provoque de nouvelles complications telles que le développement d'ascite, de saignement intestinaux mais encore des dommages rénaux et une hypertension pulmonaire (Bosch J et al, 2008). Le développement d'ascite est un facteur à risque pour le développement spontané de péritonites tandis que l'hypertension pulmonaire se manifeste avec des défaillances cardiaques (Wiest R et al, 2014). C'est alors la forme décompensée de la cirrhose hépatique.

## **6.4 Rôle néfaste de l'alcool**

L'alcool consommé est normalement métabolisé par le foie au niveau des hépatocytes via un mécanisme qui fait intervenir des oxydations et qui transforme l'alcool en composés transitoires (Acétaldéhyde, acétate) toxiques mais rapidement éliminés. Cependant, en cas de consommation excessive d'alcool, l'éthanol n'est pas assez rapidement métabolisé, ce qui provoque l'accumulation des déchets intermédiaires toxiques tels que l'acétaldéhyde capable de générer également du NADH et des radicaux libres. C'est cette accumulation de déchets métaboliques qui entraîne des dégâts au foie et initie une phase stérile de l'inflammation hépatique (Rocco A et al, 2014). L'augmentation du NADH entraîne une perturbation du métabolisme des glucides et des lipides provoquant l'augmentation de corps gras dans le foie. L'acétaldéhyde modifie les propriétés chimiques des molécules. Il est capable d'induire la peroxydation des lipides participant à la destruction des hépatocytes, transforme des protéines normales en protéines antigéniques qui participent à l'activation du système immunitaire. L'acétaldéhyde augmente la fabrication de collagène qui tend à se déposer dans le foie et entrave la bonne cicatrisation de l'organe. L'alcool est enfin capable d'entraîner la production de formes réactives de l'oxygène par l'intermédiaire de l'induction du cytochrome P450 mais également en augmentant l'activation de la NADPH oxydase des cellules de Kupffer, macrophages résidents dans le foie. Ces FRO participent également à la destruction des hépatocytes (Zhang W et al, 2007).

En parallèle, la consommation d'alcool a également la capacité d'induire une inflammation non stérile du foie via la fuite de protéines bactériennes ou de bactéries de la flore intestinale vers le foie. Suite à une consommation excessive et répétée d'alcool, une dysbiose se produit dans l'appareil digestif avec un accroissement du nombre de bactéries Gram- (Bode JC, 1984). L'alcool est également métabolisé en acétaldéhyde par l'enzyme ADH présente dans les bactéries intestinales et dans les cellules de la muqueuse intestinale. Cette génération d'acétaldéhyde est capable d'augmenter la perméabilité intestinale en redistribuant les protéines qui forment les jonctions serrées et les jonctions entre les compartiments intracellulaires (Sheth P, 2007). Enfin, en réponse à l'exposition à l'éthanol, le monoxyde d'azote et de l'anion superoxyde sont générés, réagissent ensemble pour former l'ion peroxonitrique (ONOO-) qui peut causer des dommages au cytosquelette et dégrader la barrière intestinale (McCafferty DM, 2000). Les endotoxines générées par les bactéries Gram- tels que le LPS voire directement les bactéries passent au travers de la barrière intestinale : C'est la translocation bactérienne. Ces pathogènes ou dérivés de pathogènes rentrent dans la circulation sanguine par la veine porte et débouchent au niveau du foie où ils initient l'activation des cellules de Kupffer en se liant au TLR4 et induisent la génération de FRO. Ces dernières participent à l'amplification de la destruction des tissus hépatiques (Zhang W et al, 2007 ; Moreau R 2015).

## **6.5 Les neutrophiles dans la cirrhose hépatique alcoolique**

Les cellules de Kupffer activées par l'inflammation aigue dans le foie initient une production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ . Ainsi, l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium est augmentée, ce qui entraîne l'arrivée dans le foie des neutrophiles circulants.

### **6.5.1 Le rôle néfaste des neutrophiles**

Les neutrophiles n'attaquent normalement pas les hépatocytes sains mais durant cette inflammation du foie la présence de chimiokines (Colletti LM et al., 1996) et le fait que ces hépatocytes ont une forte expression d'ICAM1 à leur surface (Farhood A et al, 1995) font qu'ils deviennent une cible des neutrophiles. Les FRO générées par les PN activés, en particulier l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diffusent dans les hépatocytes provoquant un stress oxydant intracellulaire perturbant la fonction des mitochondries. Les dommages du foie induits par les PN ont été observés dans différents modèles animaux incluant l'ischémie-reperfusion (Jaeschke H et al, 1990), endotoxinémie (Jaeschke H et al, 1991), l'hépatite alcoolique (Bautista AP, 2002 ; Jaeschke H et al, 2002 ; Ramajah S et al, 2004) ou cholestase obstructive (Guiral JS et al, 2004), et chez des patients ayant une stéatose alcoolique (Lucey MR et al, 2009).

Les protéases libérées par les PN activés contribuent également aux dommages hépatiques : l'élastase provoque directement des dommages tissulaires mais également la production du facteur CINC-1 par les cellules de Kupffer et qui permet le recrutement d'autres PN, ce qui a pour conséquence d'entretenir l'état d'inflammation.

Durant la cirrhose hépatique décompensée, de nombreuses complications s'étendent au-delà du foie. On assiste à une translocation des bactéries de la flore intestinale vers la circulation systémique et une augmentation du niveau d'endotoxine circulant comme précédemment décrit. Les travaux de Taylor et al, montrent que les patients atteints de cirrhose hépatique stable et qui présentent des neutrophiles avec une forte production spontanée de FRO sont ceux qui présentent le plus fort risque de développer des complications et des défaillances multiples d'organes (Taylor NJ, 2014). Les travaux de Mookerjee et al (Mookerjee RP et al., 2007) soulignent quant à eux que la phagocytose réduite et la production spontanée de FRO élevée des PN circulant de patients cirrhotiques est induite par la présence d'endotoxine dans le plasma des patients.

Tous ces éléments permettent de souligner le rôle à double tranchant du PN. Ils participeraient aux dégâts hépatiques dans les stades précoces des maladies hépatiques alors qu'à l'inverse leurs dysfonctions participent à l'apparition des défaillances multiples associées aux cas graves de cirrhose hépatique. Cependant de récents travaux viennent complexifier l'état des lieux et montrent que l'activité des PN serait également bénéfique dans les pathologies hépatiques.

### **6.5.2 Le rôle bénéfique des neutrophiles**

De récentes études suggèrent que le rôle du neutrophile ne serait pas uniquement délétère lors des hépatites alcooliques. Des analyses de larges cohortes de patients ont en effet pu mettre en évidence des associations entre l'infiltration du foie par des neutrophiles et une amélioration de la survie à 90 jours de ces patients (Mathurin P et al, 1996 ; Altamirano J et al, 2014). L'importance du neutrophile est révélée dans une atteinte hépatique précoce, la cholestase, caractérisée par un dépôt anarchique de collagène de type I et qui peut dégénérer en cirrhose hépatique (Friedman SL, 2003). La déplétion des neutrophiles dans ces modèles de rat a réduit l'activité collagénase nécessaire à la bonne réparation du foie (Harty MW et al, 2010). La MMP8 libérée par les neutrophiles infiltrant le foie joue un rôle important dans la bonne réparation tissulaire et la diminution de la fibrose hépatique car elle dégrade les filaments de collagène (Siller-Lopez F et al, 2004). En outre, le traitement de rats par la MMP8 entraîne l'augmentation de la transcription de HGF dans le foie, facteur de croissance permettant la prolifération des hépatocytes en remplacement de ceux détruits (Siller-Lopez F et al, 2004 ; Michalopoulos G et al, 1984). Le neutrophile peut être, en outre, une source de HGF et donc jouer un rôle dans la régénération normale du foie (Taïeb J et al, 2002).

L'état de la recherche fait donc face à un paradoxe où le neutrophile serait impliqué dans la destruction des hépatocytes mais où il jouerait également un rôle bénéfique dans les hépatites alcooliques. La consommation d'alcool pourrait être un élément clé dans la balance effet bénéfique contre délétère du neutrophile. Un des mécanismes majeurs par lequel l'alcool inhibe les fonctions du PN repose également sur le phénomène de transphosphatidylation (Exton JH et al, 1999). En présence d'éthanol, la phospholipase D du PN qui est une source majeure d'acide phosphatidique de diglycérides (diacylglycérol), ne fabrique plus ces seconds messagers activateurs des PKC, mais du phosphatidylethanol, qui est biologiquement inactif. De ce fait, les fonctions majeures des PN dépendantes de la voie PLD, sont inhibées (dégranulation, explosion oxydative, migration, phagocytose, production de cytokines). Ainsi, la consommation récurrente d'alcool pourrait empêcher la régénération du foie et exacerber les dommages de l'organe. En effet, l'éthanol inhibe des fonctions clés des neutrophiles en particulier la libération des cytokines telles que HGF (Taïeb J et al, 2002b).

## **6.6 Traitement de la cirrhose hépatique**

A l'heure actuelle le stade décompensé entraîne un taux de mortalité de 35% des cas à moins de 1 mois et 35% à 6 mois en cas d'hospitalisation (Moreau R et al, 2013). Le seul traitement curatif actuel consiste à transplanter un nouveau foie aux patients atteints. Cependant, certains traitements thérapeutiques non curatifs existent, les principales approches consistent à utiliser des corticostéroïdes afin de réduire l'inflammation. Ces traitements à base de Prednisolone ont permis une amélioration à 90 jours de la survie de patients atteints d'hépatite grave (Ramond MJ et al, 1992). D'autres approches mettent en avant l'effet bénéfique d'un traitement par le G-CSF sur des patients atteints d'hépatites graves. Une survie des patients a pu également être obtenue (Garg V et al, 2012 ; Singh V et al, 2014 ; Moreau et Rautou 2014).

De nouvelles stratégies sont à l'étude au niveau des modèles animaux ; certaines visent à traiter les origines de la défaillance, à savoir agir sur l'activité collagénase retrouvée réduite chez les patients cirrhotiques (Murawaki Y et al, 1993) et la restaurer dans le but de réduire les dépôts de collagène et les cicatrices associées à la fibrose. Ainsi, l'administration de collagénase bactérienne a permis de retarder le développement de la cirrhose mais également à induire la régression de la cirrhose hépatique déjà établie sur des modèles de lapin (Jin B et al, 2005). De récents travaux ont enfin consisté à agir sur la partie du foie non détériorée par les dépôts de collagènes et dont le dysfonctionnement cause la défaillance hépatique caractéristique des formes les plus graves de cirrhose hépatique (Nishikawa T et al, 2015 ; Moreau 2015). Les auteurs ont pu ainsi identifier un

facteur de transcription HNF4 $\alpha$  dont l'expression dans les hépatocytes est réduite durant les stades finaux de la cirrhose hépatique. L'augmentation de l'expression de ce facteur de transcription restaure les fonctions des hépatocytes afin de corriger la défaillance du foie.

## **6.7 Les neutrophiles dans d'autres pathologies inflammatoires**

### **6.7.1 Le sepsis bactérien**

Le sepsis est une condition inflammatoire systémique faisant suite à une infection bactérienne sévère, entraînant un taux élevé de mortalité chez les patients (Rehm J et al, 2009 ; Arvaniti V et al, 2010). Dans cette pathologie, les fonctions des PN sont globalement dérégulées incluant la production de FRO, la microbicidie ou la phagocytose (Rajkovic IA et al, 1986 ; Garfia C et al, 2004 ; Markwick LJ et al, 2015).

Le neutrophile peut être considéré schématiquement sous forme de trois états : Au repos (non stimulé), pré-activé mais non fonctionnelle où il a rencontré un agoniste inflammatoire qui active des voies de signalisation mais pas les systèmes moteurs, et la forme activée, pleinement fonctionnelle. Des dégâts vasculaires peuvent se produire lorsque des neutrophiles pré-activés attachés à la paroi vasculaire rencontre un second agent normalement « primant » (Wyman TH et al, 2002) ; c'est particulièrement le cas durant le sepsis où des molécules pro-inflammatoires comme le LPS circulent dans le sang des patients. Ces neutrophiles ont donc tendance à être plus facilement activables en dehors de leur site supposé d'activation. De plus, l'apoptose des neutrophiles est bloquée chez les patients souffrant d'un sepsis sévère (Biffl WL et al, 1999) alors que cette mort est centrale dans la résolution de l'inflammation. Cette inhibition de l'apoptose est généralement causée par les facteurs circulants et qui incluent notamment le LPS et des cytokines pro-inflammatoires (Sweeney JF et al, 1998).

Les fonctions du neutrophile normalement dédiées à l'élimination des agents pathogènes sont dérégulées durant le sepsis. Dans un modèle de sepsis murin mimant la maladie humaine, Delano MJ et collaborateurs ont pu mettre en évidence une susceptibilité accrue à une seconde infection bactérienne ultérieure (*Pseudomonas aeruginosa*) liée à la réduction de la production de FRO par la NADPH oxydase consécutive au sepsis. D'autres auteurs ont également pu observer une réduction de l'expression du CXCR2, récepteur à l'IL8 et induisant l'inhibition de la migration durant le sepsis (Alves-Filho JC et al, 2009).

Comme le montre le Schéma 47, dans les conditions normales et suite à une infection bactérienne, de nombreux neutrophiles entrent au site d'infection en adhérant à la surface de



l'endothélium activé puis en le traversant pour se diriger vers le foyer d'infection. Chez les patients souffrant d'un sepsis, les fortes concentrations de produits bactériens ou de cytokines pro-inflammatoires dans le sang entraînent l'augmentation de l'expression du CD64 à la surface de la cellule et augmente la force de l'adhésion du PN aux capillaires sanguins. En conséquence, beaucoup de neutrophiles restent fermement accrochés à l'endothélium et sont moins réceptifs aux chimioattractants qui normalement les dirigent jusqu'au foyer d'infection. Une hyperactivation survenant dans ce lieu inapproprié peut conduire à des lésions capillaires.

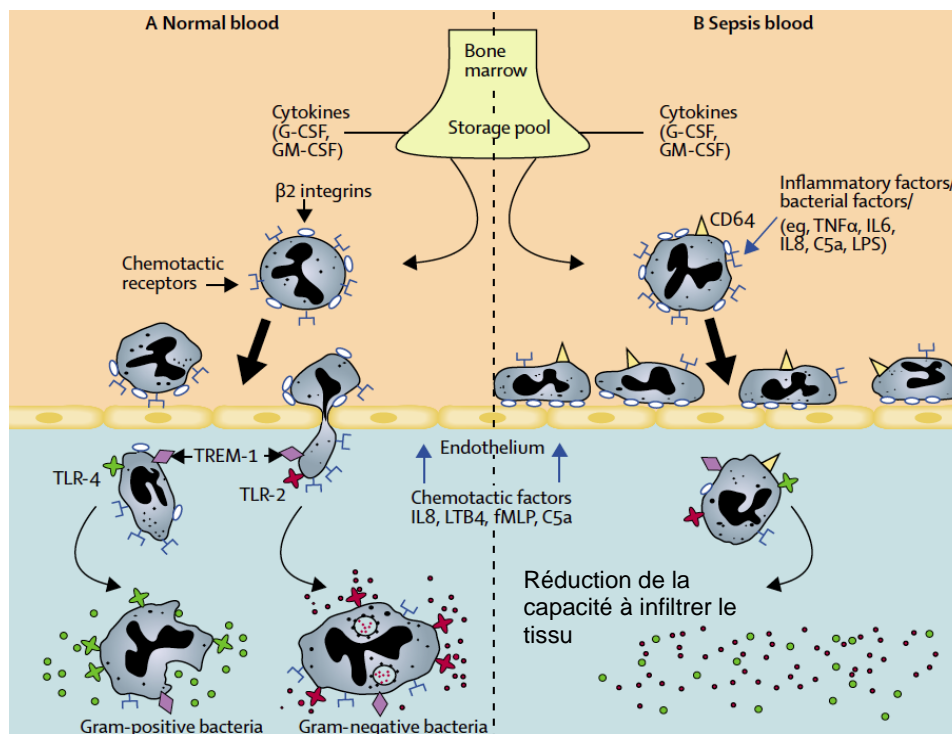


Schéma 47 : Le recrutement des neutrophiles dans un contexte de sepsis (Adapté à partir de Brown KA et al, Lancet 2006)

C'est ainsi que le prétraitement des neutrophiles par des concentrations d'IL8 similaires à celles retrouvées dans le sang de patients souffrant du sepsis inhibe la migration du neutrophile au travers de la couche endothéliale. Les fortes concentrations de C5a (Ward PA et al, 2004) ou de TNF- $\alpha$  réduisent la migration des neutrophiles. De ce fait, l'extravasation est fortement réduite et les neutrophiles sont séquestrés au niveau des capillaires sanguins et entraînent l'occlusion de ces capillaires, une hypoperfusion du tissu et une hypoxie (Astiz ME et al, 1995). De manière additionnelle, ces neutrophiles pré-activés pourraient également être activés par leur contact ferme avec la paroi endothéliale et relâcher des facteurs lytiques contribuant aux dommages endothéliaux (Brown KA et al, Lancet 2006)

## 6.7.2 Les maladies pulmonaires

Les voies respiratoires constituent l'une des premières portes d'entrées des pathogènes et des allergènes dans l'organisme. Ce dernier a mis en place plusieurs types de mécanismes de défense cellulaire au niveau de ce compartiment (Suzuki T et al, 2008). Les neutrophiles y jouent un rôle primordial où ils sont préférentiellement recrutés au niveau du poumon en réponse à des infections et inflammations. Au moins 50% des neutrophiles matures adhèrent à la paroi de l'endothélium vasculaire (margination), 33% de ces neutrophiles adhèrent au niveau des capillaires sanguins du poumon ce qui fait du poumon le premier site de l'organisme où on retrouve les neutrophiles marginés (Peters AM and al, 1985), ce recrutement s'opère au niveau des petits capillaires et nécessite une adaptation de la forme de la cellule pour passer dans leur diamètre restreint (de 2 à 15  $\mu\text{m}$ ). Cette contrainte pourrait expliquer la forte séquestration des neutrophiles au niveau des poumons (Doerschuk CM, 2000 ; Kolaczowska E et al, 2013). L'importance des neutrophiles dans l'immunité pulmonaire est mise en évidence chez des patients neutropéniques, c'est à dire présentant une réduction du nombre de neutrophiles circulant dans le sang périphérique. On y observe des infections pulmonaires par des champignons impliquant *Aspergillus* spp. ou *Candida* spp. (Lass-Flörl C et al, 2009 ; Cuenca-Estrella M et al, 2008) ou par des bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas* Spp ou encore *Haemophilus influenzae* par exemple (Mandell L et al, 2007). Les poumons sont également des organes très fréquemment infectés chez les patients CGD, dont les fonctions antibactériennes dépendantes de la NADPH oxydase sont altérées. Prêt de deux tiers d'entre eux développent effectivement des infections pulmonaires (Mahdavian SA and al, 2013 ; Magnani A et al, 2014). Les complications pulmonaires associées à ces infections, lorsqu'elles surviennent chez ces patients CGD, sont de faibles pronostiques et fréquemment responsables de séquelles. Godoy et al, ont pu identifier la présence de tissu cicatriciel au niveau des poumons des patients CGD infectés (Godoy MC et al, 2008).

L'infiltration des neutrophiles peut avoir néanmoins des conséquences néfastes dans les maladies chroniques affectant le poumon notamment durant l'asthme. En effet l'augmentation de la quantité de neutrophiles dans le crachat des patients est corrélée à l'obstruction des voies aérienne des patients asthmatiques (Shaw DE et al, 2007 ; Woodruff PG et al, 2001). De plus, une augmentation de la concentration de facteurs chimiotactiques des neutrophiles (IL8, LTB<sub>4</sub>, IL17A) et de médiateurs de l'inflammation (élastase, MMP-9, GM-CSF et TNF- $\alpha$ ) a été mesurée dans le plasma, le lavage bronchoalvéolaire des patients développant un asthme sévère (Teran LM et al, 1997 ; Vachier I et al, 2005 ; Wenzel SE et al, 1990, Howarth PH et al, 2005 ; Morishima Y et al, 2013). Ainsi comme abordé lors du chapitre 3 consacré aux NADPH oxydases, une surproduction de FRO entraîne des dommages pulmonaires au cours des ALI (acute lung injury) et ARDS (Acute

respiratory distress syndrome) (Carnesecchi S et al, 2012) mais aussi durant l'asthme (Ökrös Z et al, 2011). La fibrose pulmonaire partage le même type de dommages puisqu'elle est caractérisée par l'endommagement du tissu interstitiel pulmonaire tel que l'épithélium alvéolaire, l'endothélium des capillaires sanguins pulmonaires, la membrane basale périvasculaire et les tissus périlymphatiques et qui conduisent au développement de tissus cicatriciels composé de collagène de type I dans le poumon (Lin CH et al, 2013), une perte d'élasticité de l'organe et une diminution des fonctions respiratoires. Il existe ainsi des ressemblances avec la fibrose hépatique. Bargagli E et collaborateurs (Bargagli E et al, 2007), ont pu mettre en évidence une forte hausse de la concentration de protéines carbonylées, biomarqueurs du stress oxydant (Dalle-Donne I et al, 2003), et du nombre de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Tanaka K et collaborateurs (Tanaka K et al, 2012), montrent alors, dans une modèle d'induction de la fibrose hépatique chez la souris, que l'inhalation ou l'administration orale de SOD protège ces souris de la fibrose en améliorant l'élasticité de l'organe et en restaurant les fonctions respiratoires. Ces différents travaux suggèrent alors que les FRO produites contribueraient à la mise en place et au développement de la fibrose hépatique.

Au cours de l'inflammation, les neutrophiles libèrent également leur contenu granulaire tel que l'élastase, la protéinase 3 ou encore la cathepsine G contenues dans les granules azurophiles et impliquées dans l'élimination des bactéries. Certaines de ces composés granulaires sont également impliqués dans la réparation tissulaire (Chua F et al, 2006). Cependant malgré leurs fonctions antibactériennes, les protéases sont également impliquées dans les pathologies affectant le poumon notamment en prolongeant l'inflammation pulmonaire (Hirche TO et al, 2004). L'élastase, en particulier, est exprimée à un niveau élevé dans le liquide broncho-alvéolaire et le plasma de patients victimes de dommages pulmonaires ou de syndrome de détresse respiratoire (Lee CT et al, 1981 ; Donnelly SC et al, 1995). Les niveaux d'élastase sont corrélés avec la sévérité des dommages pulmonaires (Donnelly SC et al, 1995). Ainsi, l'effet protecteur de l'inhibiteur de l'élastase (sivelestat également nommé ONO-5046) a pu être observé chez des patients ayant subi un pontage cardio-pulmonaire, connu pour induire des dommages aigus au poumon (Fuji M et al, 2010).

Le rôle important de l'élastase est également illustré dans une pathologie pulmonaire caractéristique : la mucoviscidose. Il s'agit d'une maladie génétique causée par des mutations au niveau du gène CFTR qui est un canal chloride qui régule l'homéostasie des fluides à la surface de l'épithélium pulmonaire (Gadsby DC et al, 2006). L'élastase du neutrophile joue un rôle critique dans la pathologie puisqu'elle est en mesure de dégrader des récepteurs impliqués dans la réponse immune contre la mucoviscidose, tels que les récepteurs CD2, CD4 ou CD8 à la surface des lymphocytes (Döring G et al, 1995) ou encore CD16, CD43 ou le récepteur du TNF $\alpha$  à la surface des neutrophiles

(Tosi MF et al, 1992). Le Gars M et collaborateurs ont montré que l'élastase du neutrophile a la capacité d'induire la dégradation du CFTR via l'activation des calpaïnes intracellulaires (Le Gars M et al, 2013). Cette découverte est importante puisqu'elle démontre que l'élastase du neutrophile serait capable d'agir directement à l'intérieur des cellules cibles. Ceci soulève des interrogations sur la capacité de l'élastase à dégrader avec les protéines des neutrophiles impliquées dans la lutte antibactérienne telles que la gp91<sup>phox</sup>, comme on le montre dans une partie de notre étude expérimentale présentée dans le manuscrit 2.

Ainsi, les inhibiteurs des protéases comme l' $\alpha$ 1-antitrypsine (AAT) (un inhibiteur naturel des sérine protéases), élafine, SLPP1 (secretory leukocyte proteinase inhibitor) et MNEI (monocytes/neutrophil elastase inhibitor) et particulièrement le NEI (inhibiteur de l'élastase) peuvent être des outils à considérer afin de réduire les dommages causés lors des atteintes pulmonaires. Par exemple une augmentation de l'incidence des emphysèmes pulmonaires est retrouvée chez les patients ayant une déficience pour l'AAT. Les dégâts engendrés par la fumée de cigarette entraînent le développement d'emphysème pulmonaire et suggèrent que l'élastase du neutrophile pourrait être un effecteur principal des dommages protéolytiques du poumon dans cette atteinte (Eriksson S, 1964). Certains travaux ont émis l'hypothèse de vectoriser l'AAT dans des HDL (high density lipoprotein ou Lipoprotéine de haute densité). En effet une activité anti-élastase a pu être identifiée dans les HDL. De plus ces HDL peuvent être enrichis en AAT (Ortiz-Munoz G et al, 2009). Moreno JA, et collaborateurs ont ainsi pu démontrer que l'administration intraveineuse d'HDL enrichis en AAT avait la capacité de réduire l'inflammation pulmonaire induite par l'élastase dans des modèles d'emphysème pulmonaire (Moreno JA et al, 2014). Les HDL se sont accumulés au niveau du poumon des souris et ont permis d'améliorer la disponibilité de l'AAT et ainsi réduire l'emphysème pulmonaire contrairement à l'injection des mêmes concentrations d'AAT sans HDL. De manière intéressante, cette stratégie a contribué à réduire l'activité des MMP-2 et MMP-9, deux métalloprotéinases fortement impliqués dans le développement d'emphysème pulmonaire mais également dans la dégradation de la matrice extracellulaire du foie à l'origine des cicatrices caractéristiques de la cirrhose hépatique (Veidal SS et al, 2011).

### **III. ETUDE EXPERIMENTALE**

# 1 - Objectifs de recherche

Les polynucléaires neutrophiles (PN) sont des cellules de l'immunité fortement impliquées dans l'élimination des agents pathogènes. Deux grands mécanismes de défense sont mis en œuvre, l'un dépend de l'oxygène et met en jeu la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) via le complexe NADPH oxydase, NOX2, composé de protéines cytosoliques (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, Rac2) et membranaires (gp91<sup>phox</sup>/NOX2 et p22<sup>phox</sup>), et l'autre la libération de protéines à activité antimicrobienne et d'enzymes contenues dans les granules dont certaines comme la myéloperoxydase qui utilise le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comme substrat, et d'autres qui fonctionnent indépendamment des FRO. Ces fonctions sont stimulées par divers agents pro-inflammatoires solubles, tels que le peptide d'origine bactérienne fMLP qui se lie au récepteur membranaire fPR à la surface du neutrophile. Ces agents entraînent la génération de second messagers lipidiques qui à leur tour induisent l'activation en cascade de protéine kinases (AKT, PKC) et des MAP-Kinases (ERK1/2, p38-MAPK). Cette production de FRO est ainsi régulée à différents niveaux : la signalisation interne induisant la phosphorylation et la translocation membranaire des composants de la NOX2, l'expression des protéines impliquées dans la cascade d'activation du complexe et leur devenir au cours de l'activation du neutrophile. L'importance des FRO dans l'activité anti infectieuse est illustrée par une maladie génétique, la granulomatose sceptique chronique ou « Chronic Granulomatous Disease » (CGD) due à des mutations des composants de la NOX2. Les patients développent ainsi des infections récurrentes potentiellement mortelles. Des défaillances sévères de la NOX2 sont également observées dans d'autres pathologies non héréditaires mais acquises et qui supposent des défauts de signalisation, d'expression ou encore de dégradation des acteurs impliqués.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes qui sous-tendent l'explosion oxydative des neutrophiles normaux et issus de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée. Ces patients présentent, en effet, une importante susceptibilité aux infections bactériennes et un sepsis sévère qui est une cause majeure de mortalité chez ces patients. Deux niveaux de régulation ont été étudiés : l'activation des effecteurs de signalisation induite par le récepteur du fMLP qui conduit à l'activation de la NOX2 et l'expression des composants de la NADPH oxydase. Les travaux de recherche que j'ai développés s'articulent autour de deux projets complémentaires.

Mon premier projet a consisté à explorer la contribution d'une protéine kinase ubiquitaire qui restait ignorée jusqu'ici dans l'explosion oxydative, mTOR. Elle est connue pour être activée via AKT et PLD, qui sont deux effecteurs majeurs de l'activation de la NADPH oxydase. Ainsi, l'utilisation de son inhibiteur pharmacologique la rapamycine et sa déplétion par interférence à ARN m'ont permis de montrer une contribution majeure de mTOR dans l'activation des MAPK, la

génération de FRO et l'activité anti-bactérienne du neutrophile. Dans les neutrophiles de patients cirrhotiques, j'ai mis en évidence des défaillances sévères de l'activité NADPH oxydase associées à un défaut d'activation des voies MAPK et un effet aggravant de la Rapamycine confirmant une implication de mTOR. Ce premier projet a fait l'objet d'une publication en 2013 (Rolas et Coll, Hepatology) et sera présenté comme telle.

Dans le deuxième projet, j'ai recherché d'autres bases moléculaires du déficit d'explosion oxydative des neutrophiles des patients cirrhotiques et j'ai montré un défaut d'expression des composants de la NADPH oxydase, notamment de gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup>. J'ai alors proposé un mécanisme qui permet d'expliquer ces déficits ; une dégradation de la gp91<sup>phox</sup> par l'élastase libérée au cours de la dégranulation des neutrophiles ou présentes dans le plasma des patients. De manière intéressante, j'ai pu corriger les déficits d'activité oxydasique et d'expression de la gp91<sup>phox</sup> des neutrophiles de patients cirrhotiques à l'aide d'un agoniste des TLR7 et 8. Les conclusions de ce deuxième projet ne sont pas encore publiées et sont présentées également en anglais sous forme de manuscrit préliminaire, à améliorer avant sa soumission pour publication d'ici un mois. Cette partie sera complémentée par des résultats annexes non publiés concernant les manuscrits 1 et 2.

J'ai également contribué à un projet de thèse en cours de Mr Boussif Abdelali sur la défaillance de la dégranulation des neutrophiles des patients cirrhotiques. Ce travail est en cours de révision favorable dans le « Journal of Hepatology ». Il est également présenté sous forme de manuscrit soumis. Nous avons ainsi identifié une défaillance d'activation des effecteurs de la dégranulation des neutrophiles de patients (AKT et p38-MAPK). Une stratégie utilisant l'agoniste du TLR7/8 a également été proposée pour corriger les défaillances.

Pour terminer, j'ai eu l'opportunité d'utiliser une approche par une infection virale pour identifier ou détecter des anomalies transductionnelles de la voie du fPR susceptibles d'expliquer les défaillances d'activité de la NADPH oxydase dans les cellules HEK exprimant le fPR et dans les monocytes humains infectés. Pour cela, j'ai utilisé un alpha virus atténué, le virus O'nyong-nyong (ONN), proche du virus du Chikungunya en collaboration avec les virologues de l'Université de la Réunion, cette approche a permis d'identifier deux étapes transductionnelles très fortement impactées (AKT, p38-MAPK et ERK1/2), l'une précoce impliquant une atteinte au niveau des protéines G et l'autre tardive au niveau du complexe NADPH oxydase. Nos conclusions originales ont fait l'objet d'un manuscrit qui a été évalué par le Journal PLoS Pathogens qui nous propose de le renforcer pour une re-soumission. Les résultats de ce projet, bien que présentant de fortes similitudes avec les défaillances induites au cours de la cirrhose alcoolique, ne seront cependant pas discutés, pour des raisons d'homogénéité et d'espace.

## **2 - Résultats expérimentaux**

### **2.1 Publication 1 : L'inhibition de mTOR par la rapamycine aggrave la déficience d'explosion oxydative des neutrophiles de patients cirrhotiques**



# Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Aggravates the Respiratory Burst Defect of Neutrophils From Decompensated Patients With Cirrhosis

Loïc Rolas,<sup>1</sup> Nesrine Makhezer,<sup>2</sup> Soumeia Hadjoudj,<sup>2</sup> Jamel El-Benna,<sup>1</sup> Bahia Djerdjouri,<sup>2</sup> Laure Elkrief,<sup>3</sup> Richard Moreau,<sup>1,3</sup> and Axel Périanin<sup>1</sup>

Cirrhosis is commonly accompanied by impaired defense functions of polymorphonuclear leucocytes (PMNs), increased patient susceptibility to infections, and hepatocellular carcinoma (HCC). PMN antimicrobial activity is dependent on a massive production of reactive oxygen species (ROS) by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 2 (NADPH oxidase 2; NOX2), termed respiratory burst (RB). Rapamycin, an antagonist of mammalian target of rapamycin (mTOR), may be used in the treatment of HCC and in transplanted patients. However, the effect of mTOR inhibition on the PMN RB of patients with cirrhosis remains unexplored and was studied here using the bacterial peptide, formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), as an RB inducer. fMLP-induced RB of PMN from patients with decompensated alcoholic cirrhosis was strongly impaired (30%-35% of control) as a result of intracellular signaling alterations. Blocking mTOR activation (phospho-S2448-mTOR) with rapamycin further aggravated the RB defect. Rapamycin also inhibited the RB of healthy PMNs, which was associated with impaired phosphorylation of the NOX2 component, p47<sup>phox</sup> (phox: phagocyte oxidase), on its mitogen-activated protein kinase (MAPK) site (S345) as well as a preferential inhibition of p38-MAPK relative to p44/42-MAPK. However, rapamycin did not alter the fMLP-induced membrane association of p47<sup>phox</sup> and p38-MAPK in patients' PMNs, but did prevent their phosphorylation at the membranes. The mTOR contribution to fMLP-induced RB, phosphorylation of p47<sup>phox</sup> and p38-MAPK was further confirmed by mTOR knockdown in HL-60 cells. Finally, rapamycin impaired PMN bactericidal activity, but not bacterial uptake. **Conclusion:** mTOR significantly up-regulates the PMN RB of patients with cirrhosis by p38-MAPK activation. Consequently, mTOR inhibition by rapamycin dramatically aggravates their PMN RB defect, which may increase patients' susceptibility to infection. Thus, concerns should be raised about the use of rapamycin in immuno-depressed patients. (HEPATOLOGY 2013;57:1163-1171)

**R**eactive oxygen species (ROS) produced by polymorphonuclear leukocytes (PMNs), monocytes or macrophages, termed respiratory burst (RB) or oxidative stress (OS), play a key role in antimicrobial host-defense systems.<sup>1</sup> The enzyme responsible for the phagocyte RB, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2 (NOX2), is a membrane multiprotein complex whose activation requires the phospho-

rylation and membrane translocation of cytosolic components, among which p47<sup>phox</sup> (phox: phagocyte oxidase) plays an important role.<sup>2</sup> In pathological situations, ROS production becomes inappropriately regulated. An excessive production of ROS induces tissue damage, which has been implicated in various diseases,<sup>1</sup> including hepatic fibrosis.<sup>3</sup> A deficient production of ROS promotes patients' susceptibility to microbial infections.<sup>1</sup>

**Abbreviations:** AKT, protein kinase B; ERK1/2, extracellular signal regulated kinase 1/2; fMLP, formyl-Met-Leu-Phe; HCC, hepatocellular carcinoma; MAPK, mitogen-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NOX2, NADPH oxidase 2; phox, phagocyte oxidase; OS, oxidant stress; PH, portal hypertension; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; PKC, protein kinase C; PMN, polymorphonuclear leukocyte; RB, respiratory burst; ROS, reactive oxygen species; S345, serine 345; siRNA, short interfering RNA.

From the <sup>1</sup>INSERM U773, CRB3, Faculté de Médecine X. Bichat, Paris, France; <sup>2</sup>Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène, Alger, Algérie; and <sup>3</sup>Service d'Hépatologie, Hôpital Beaujon, Cllichy, France.

Received April 28, 2012; accepted October 3, 2012.

This work was supported by INSERM, CNRS, LabEx Inflamed, and a grant from l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Cirrhosis is a typical example in which inappropriate ROS production induces both tissue damage and patient susceptibility to infections.<sup>4</sup> PMNs have been shown to contribute to liver injury in animal models<sup>5</sup> and patients with alcoholic hepatitis.<sup>6</sup> In these patients, the level of intrahepatic expression of "neutrophil-attractant" CXC chemokines, interleukin-8 and ENA-78 (CXCL5), have been shown to correlate with poor survival.<sup>7</sup> Direct evidence for the importance of ROS in PMN-induced liver injury is provided by the observation of an intracellular OS in hepatocytes during the PMN infiltration<sup>8</sup> and in p47<sup>phox</sup> knockout mice.<sup>3</sup> A common complication of liver fibrosis is the development of sepsis, a major cause of death,<sup>9</sup> which is associated with impaired PMN RB, microbicidal activity, and phagocytosis.<sup>10</sup> PMN dysfunctions were found to be reversible after endotoxin removal from patient plasma.<sup>11</sup> In other studies, persistent cellular defects were also observed.<sup>12</sup> An impaired RB of PMN was also reported in liver transplant recipients suffering from posthepatic cirrhosis.<sup>13</sup>

Rapamycin is used clinically for various purposes because of its ability to antagonize the kinase activity of mammalian target of rapamycin (mTOR). Inhibition of mTOR is under evaluation in patients with hepatocellular carcinoma (HCC).<sup>14,15</sup> Moreover, because there is some experimental evidence that mTOR is involved in portal hypertension (PH)-associated angiogenesis, it has been suggested that mTOR inhibition could be a target for future therapies in PH.<sup>16,17</sup> Rapamycin is also used as an immunosuppressive drug to prevent rejection of transplanted organs.<sup>18</sup> Rapamycin binds to the immunophilin, FKBP12, then inhibits mTOR, a protein kinase that plays an important role in protein synthesis, cell cycle, and cancer.<sup>19</sup> mTOR exists at least in two multiprotein complexes.<sup>20</sup> In one complex (mTORC1), mTOR is associated with Raptor and binds rapamycin. In the other complex (mTORC2), mTOR is associated with Rictor and cannot be directly inhibited by rapamycin.<sup>21</sup> mTOR is activated by the protein kinase B (PKB or AKT) pathway<sup>22</sup> and by phosphatidic acid generated by phospholipase D (PLD).<sup>19</sup> We previously showed that AKT and PLD are two major signaling effectors in PMN and regulate NOX2 activity induced

by the bacterial peptide, fMet-Leu-Phe (fMLP).<sup>23,25,26</sup> However, whether mTOR up-regulates the RB of PMNs is unknown. If this were the case, rapamycin should aggravate the RB deficiency of PMNs from patients with cirrhosis, which may have clinical implications. To explore this hypothesis, the effect of mTOR inhibition was studied on RB and signaling events of PMNs from patients with decompensated alcoholic cirrhosis, using fMLP as an inducer.

This study shows that alcoholic cirrhosis strongly impaired the fMLP-induced RB of PMNs as a result of altered phosphorylation of a major NOX2 component, p47<sup>phox</sup>(S345), by mitogen-activated protein kinases (MAPKs). The results further show that mTOR is a novel effector of the PMN RB of control subjects and patients with cirrhosis. Consequently, mTOR inhibition by rapamycin dramatically aggravated the RB defect of PMNs of patients with cirrhosis through the inhibition of p38-MAPK signaling and phosphorylation of p47<sup>phox</sup>(S345). These results suggest that rapamycin should be used with caution in patients with cirrhosis.

## Patients and Methods

**Patients.** Patients were hospitalized in the Liver Unit of Beaujon Hospital (Clichy, France). Inclusion criteria were age over 18 years, biopsy-proven cirrhosis, and Child-Pugh class B or C cirrhosis. Patients had a history of excessive alcohol ingestion (50 g/day), but no other causes of liver disease. Viral serologies for hepatitis B virus and hepatitis C virus were negative. Alcohol consumption was stopped for at least 3 days. Clinical characteristics of patients are shown in Table 1. Exclusion criteria were evidence of recent gastrointestinal bleeding, current bacterial infections, and treatment with corticosteroids, pentoxifylline, and other immunosuppressive drugs in the past 30 days, and presence of HCC, other cancer, or human immunodeficiency virus infection. Healthy subjects (controls) were hospital employee volunteers. The study was approved by our institutional review board, and written informed consent was obtained from all patients.

Because of space constraints, reagents and techniques used in this study are detailed in the Supporting

Address reprint requests to: Axel Périanin, M.D., Ph.D., INSERM U773, CRB3, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. E-mail: axel.perianin@inserm.fr; fax: 33 1 57 27 74 11.

Copyright © 2012 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.26109

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.



**Table 1. Characteristics of Patients**

Variable	
No. of patients	17
Age, years	56 ± 3
Female/male	8/9
Ascites, n (%)	13 (76)
HCC, n (%)	0 (0)
Encephalopathy, n (%)	6 (36)
Serum albumin, g/L	21.6 ± 1.6
Serum bilirubin, μmol/L	168 ± 45
Prothrombin time, %	45 ± 6
International normalized ratio	2.06 ± 0.27
Serum creatinine, μmol/L	68 ± 6
Child-Pugh score	11 ± 1
Child-Pugh class C, n (%)	13 (76)
MELD score	20.4 ± 2.4
White blood cell count, per mm <sup>3</sup>	9,650 ± 2,090
Treatment with β-blockers, n (%)	8 (47)

Plus minus values are means ± standard error of the mean.

Abbreviation: MELD, Model of End-Stage Liver Disease.

Materials. These include cell-culture media, antibodies,<sup>24</sup> mTOR short interfering RNA (siRNA) oligonucleotides,<sup>18</sup> PMN isolation by sedimentation of Ficoll-Hypaque and Dextran,<sup>21</sup> cell culture and transfection,<sup>25</sup> PMN functional activities, such as RB studied by the cytochrome c reduction assay<sup>23</sup> and chemiluminescence,<sup>25</sup> phagocytosis of DsRed-conjugated *Escherichia coli*, PMN bactericidal activity, phosphorylation of signaling effectors, and membrane translocation of p47phox and p38-MAPK, which were studied by western blotting.<sup>26</sup>

**Statistical Analysis.** Differences between means were identified using the Student paired *t* test or Mann-Whitney's U test, with a threshold of *P* < 0.05.

## Results

**PMNs From Patients With Alcoholic Cirrhosis Exhibited an Impaired fMLP-Induced RB and p38-MAPK Activation.** PMNs from patients with decompensated alcoholic cirrhosis were stimulated with varying fMLP concentrations and their superoxide production by NOX2 was compared to that of PMNs from healthy volunteers (Fig. 1A). Suboptimal stimulation of PMNs with fMLP (25-50 nM) revealed a defective RB of PMNs from patients with cirrhosis. This dysfunction was aggravated under optimal PMN stimulation with 0.1-1.0 μM fMLP, resulting in a total superoxide production of only approximately 35% of control. This severe dysfunction was also confirmed in whole blood, in which fMLP-induced RB was measured by chemiluminescence (Supporting Fig. 1). This defective RB was associated with a significant decreased phosphorylation of the NOX2 component,

p47phox, on its MAPK site, serine 345 (S345) (Fig. 1B,C). This site was previously shown to regulate NOX2 activity.<sup>24</sup> Consistent with this observation, the fMLP-induced activation of p38-MAPK was also impaired in patients' PMNs (Fig. 1B,D; *P* < 0.05). The intensity and duration of NOX2 activity induced by fMLP in healthy PMNs can be potentiated by various agents, such as cytochalasin B,<sup>27</sup> a fungal toxin that depolymerizes actin filaments. Interestingly, the deficient RB of patients' PMNs was not potentiated by cytochalasin B, unlike the RB of healthy PMNs (Fig. 1E), suggesting that biochemical alterations of cirrhotic PMNs may affect signaling events regulated by the cytoskeleton.

**Blocking mTOR Activation by Rapamycin Inhibited fMLP-Induced PMN RB Parameters and MAPK Activation.** Human PMNs express mTOR, which has been previously shown to regulate chemotaxis.<sup>28</sup> Whether mTOR regulates the PMN RB induced by proinflammatory agents remains unexplored. In resting PMNs of healthy donors, an active phosphorylated form of mTOR (phospho-S2448) was weakly detectable (Fig. 2A,B). PMN stimulation with fMLP greatly increased mTOR phosphorylation, which can be blocked with low rapamycin concentrations (10-20 nM), although these drug concentrations tended to increase basal phosphorylation of mTOR. The rapamycin concentration that reduced 50% of the fMLP-induced phosphorylation of mTOR (IC<sub>50</sub>) was approximately 3-5 nM. Rapamycin also inhibited fMLP-induced RB of healthy PMNs, reducing both total production of superoxide (Fig. 2C) and initial rate of RB (data not shown), which suggests a role of mTOR in the process of NOX2 activation. Rapamycin also inhibited fMLP-induced RB of cirrhotic PMNs (Fig. 2C), resulting in a dramatic aggravation of their RB defect (Fig. 2D). A rapamycin-inhibitory effect was also observed on RB measured in whole blood (Supporting Fig. 2).

Given the very weak RB of PMNs from patients with cirrhosis, the biochemical alterations induced by rapamycin were further investigated using healthy PMNs. The RB of PMN is dependent on a rapid phosphorylation of p47phox on multiple sites, among which is S345.<sup>24</sup> Rapamycin significantly reduced the phosphorylation of p47phox(S345) induced by fMLP, whereas basal phosphorylation of p47phox tended to increase (Fig. 3A,B). A rapamycin IC<sub>50</sub> value of 3-5 nM was obtained for the fMLP-induced p47phox(S345) phosphorylation without considering basal phosphorylation values. The S345 of p47phox is phosphorylated by two families of MAPKs: p38-MAPK and p44/42-MAPK (extracellular signal

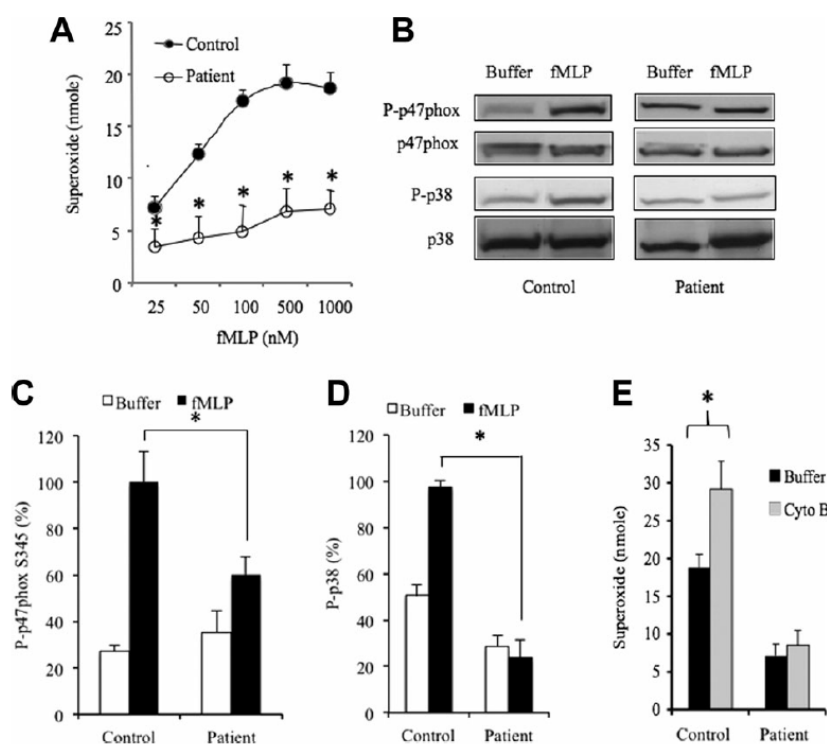


Fig. 1. PMN from patients with cirrhosis exhibited impaired fMLP-induced RB. (A) PMNs from healthy volunteers (control) and patients with cirrhosis were stimulated with fMLP (25–1,000 nM). RB is expressed in nmole/ $10^6$  cells ( $n = 12$  in each group;  $*P < 0.05$  versus control). (B–D) PMNs were stimulated with fMLP (1  $\mu$ M; 75 seconds). The phosphorylated forms of p47phox(S345) and p38-MAPK are expressed as the percentage of control values obtained with fMLP ( $n = 4$  in each group;  $*P < 0.05$ ). (E) PMNs were treated without (Buffer) or with cytochalasin B (5  $\mu$ g/mL; 5 minutes) and were stimulated with fMLP (1  $\mu$ M; 75 seconds), and RB is expressed in nmole superoxide/ $10^6$  PMN ( $n = 8$  in each group;  $*P < 0.05$ ).

regulated kinase 1/2; ERK1/2).<sup>29</sup> Rapamycin partially inhibited the activation of both MAPKs induced by fMLP in a concentration-dependent manner (Fig. 3D–F). However, p38-MAPK was strongly inhibited ( $IC_{50}$  value: 3–5 nM), relative to ERK1/2 ( $IC_{50}$  of 20 nM), which suggests a preferential role of p38-MAPK in the activation of NOX2 mediated by mTOR.

**Rapamycin Inhibited fMLP-Induced Phosphorylation of p47phox and p38-MAPKs at the Membranes, but Not Their Translocation From the Cytosol, in Patient PMNs.** The RB of PMNs is dependent on the translocation of cytosolic p47phox at the plasma membranes to form an active complex with NOX2.<sup>1,2</sup> Whether mTOR regulates the translocation of cytosolic

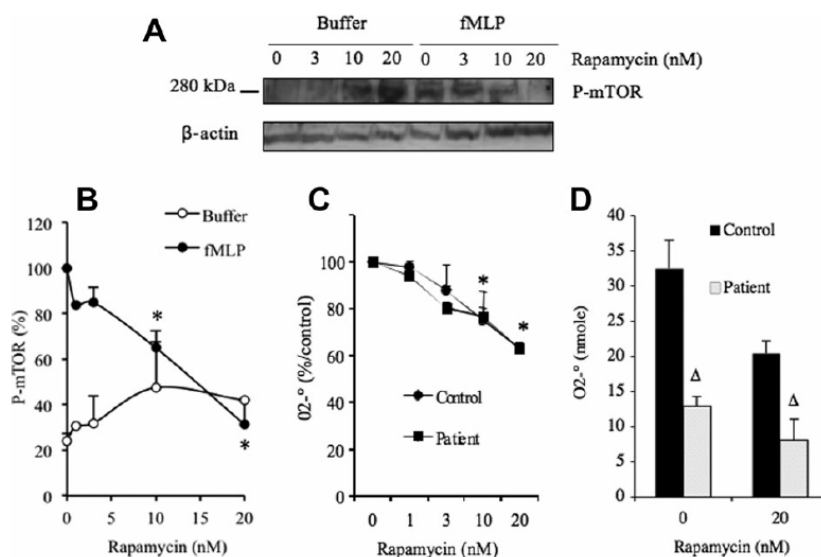


Fig. 2. fMLP-induced phosphorylation of mTOR in PMNs and RB were inhibited by rapamycin. PMNs from healthy donors were pretreated with rapamycin (25 minutes) before stimulation with fMLP (1  $\mu$ M; 75 seconds). The phosphorylated form of mTOR (S2448) (A) was quantified and is expressed as the percentage of control values obtained with fMLP (B) ( $n = 5$ ;  $*P < 0.05$ ). (C) PMNs from healthy donors (Control) and patients with cirrhosis were pretreated without (control) or with rapamycin (3–20 nM; 25 minutes) before stimulation with fMLP (1  $\mu$ M). Results represent the amount of superoxide expressed as the percentage of that of the respective untreated cells (C) ( $*P < 0.05$ ) or in nmole O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/ $10^6$  PMN (D) ( $n = 5$  in each group;  $\Delta P < 0.05$  versus healthy donors).

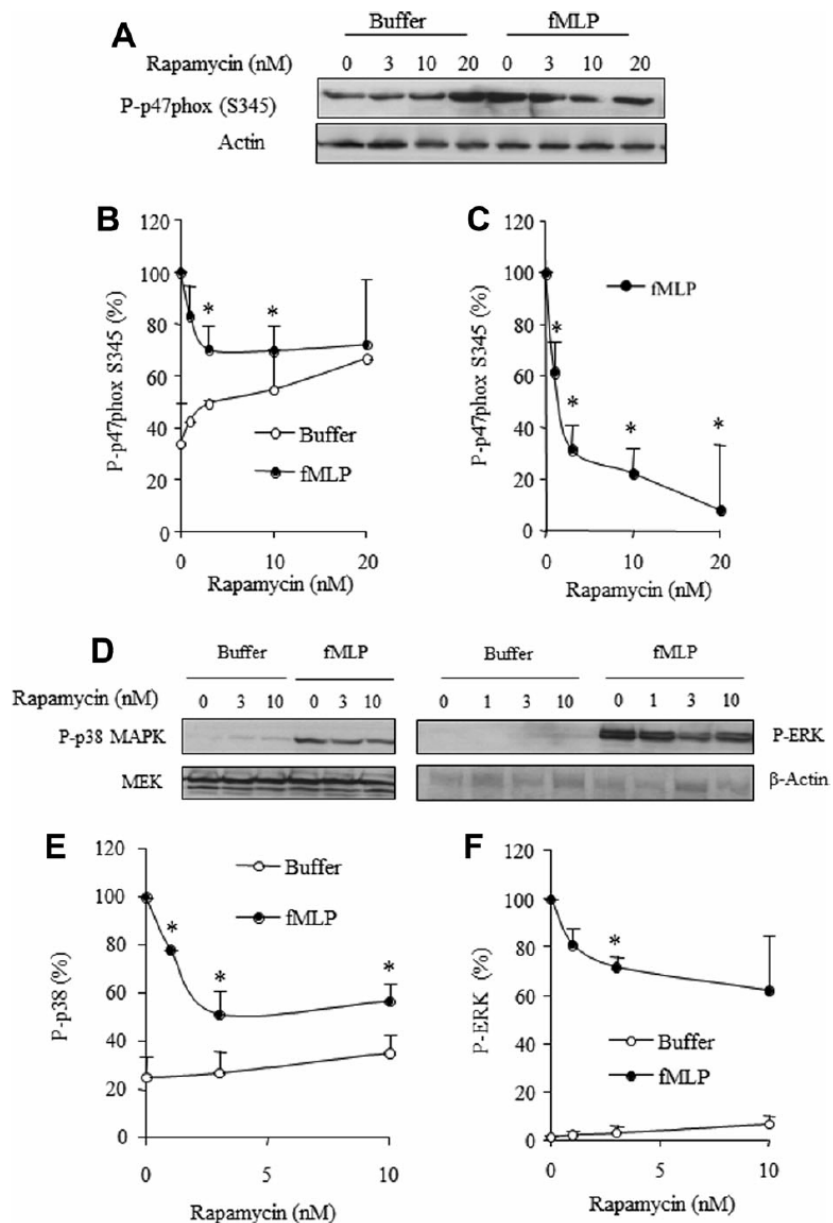


Fig. 3. Rapamycin inhibited the fMLP-induced phosphorylation of p47phox (S345), p38-MAPK and p44/42MAPK in PMNs. Healthy PMNs pretreated without (control) or with rapamycin (1–20 nM; 25 minutes) were stimulated with fMLP (1  $\mu$ M; 75 seconds). Phospho-p47phox(S345) (A and B), phospho-p38-MAPK, and phospho-p44/42-MAPK (P-ERK) (C) were quantified and are expressed as the percentage of control values obtained with fMLP ( $n = 5$  in each group;  $*P < 0.05$  versus control). In the particular case of phospho-p47phox, which was elevated at basal state, the net phosphorylation values induced by fMLP were calculated after subtracting basal phosphorylation values (C) ( $n = 5$ ;  $*P < 0.05$  versus control). The phosphorylated form of p38-MAPK (P-p38-MAPK; left part of D) and p44/42-MAPK (P-ERK, right part of D) was quantified and are expressed as the percentage of control (E and F, respectively;  $n = 4$  in each group;  $*P < 0.05$  versus control).

components of NOX2 was studied by measuring the amount of phosphorylated p47phox and p38-MAPK at the membranes of PMNs of patients with cirrhosis. For this purpose, the patient's PMNs whose RB was strongly inhibited by rapamycin were selected (70% of patients). fMLP significantly increased the amount of both p47phox (Fig. 4A) and p38-MAPK (Fig. 4C) at the membranes of cirrhotic PMNs, consistent with a redistribution of both effectors. However, the translocation of both effectors was not altered by rapamycin. By contrast, their phosphorylation was almost completely inhibited (Fig. 4C,F).

**Depletion of mTOR in Neutrophil-Like HL-60 Cells Inhibited fMLP-Induced RB Parameters.** To further reinforce the possibility that mTOR is a novel effector of PMN RB, superoxide production was studied in mTOR-depleted cells. Treatment of neutrophil-like HL-60 cells with mTOR siRNA oligonucleotides reduced mTOR expression by approximately 50% ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5A,B). fMLP-induced RB was also impaired in the same proportion (Fig. 5C), whereas the phosphorylation of p38-MAPK and p47phox(S345) were markedly inhibited. These data confirm that mTOR is rapidly activated in fMLP-stimulated PMNs and contributes to



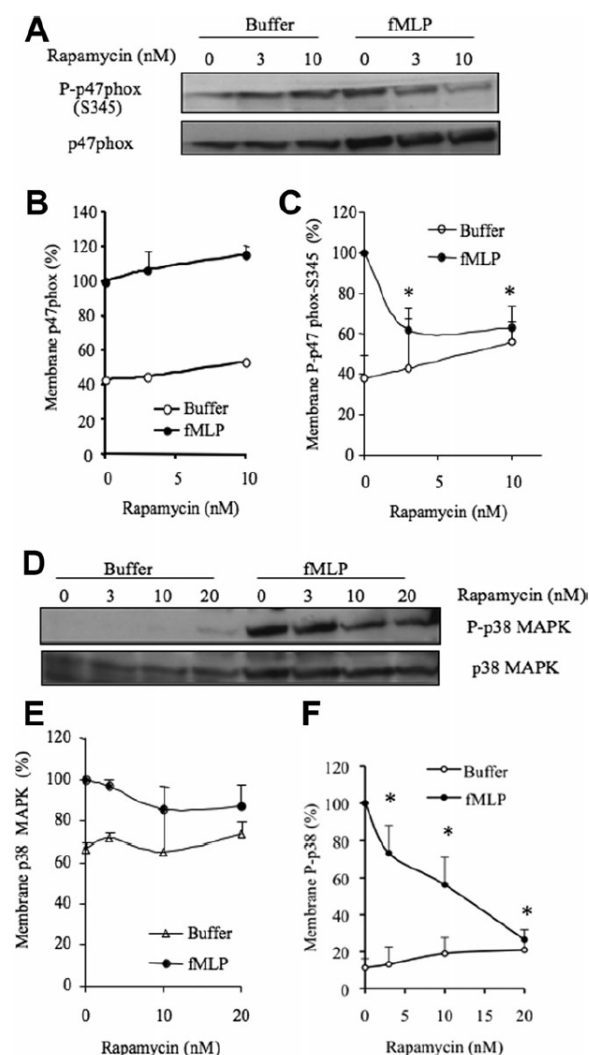


Fig. 4. Rapamycin prevented fMLP-induced phosphorylation of membrane-associated p47phox and p38-MAPK in PMN, but not their membrane translocation. PMNs pretreated without (control) or with rapamycin (25 minutes) were stimulated with fMLP (1  $\mu$ M; 90 seconds). The cell particulate fraction was prepared for the detection of phosphorylated p47phox (A) and p38-MAPK. Data are expressed as the percentage of control values obtained with fMLP ( $n = 4$  in each group; \* $P < 0.05$ ).

NOX2 activation by the phosphorylation of p47phox(S345) by MAPKs.

**Consequences of mTOR Inhibition on PMN Bacterial Uptake and Killing.** Inhibition of RB by rapamycin suggests that it may affect PMN antibacterial activities. To explore this possibility, the effects of rapamycin were studied on bacterial engulfment and killing by PMNs. Interestingly, rapamycin concentrations that blocked mTOR activation (10–20 nM) did not alter uptake of DsRed-conjugated *E. coli* (Fig. 6A,B). However, PMN killing activity was

impaired (Fig. 6C), which is consistent with a defective RB, which we also observed when a particulate inducer of RB, such as zymosan, was used (Supporting Fig. 3B).

## Discussion

This study provides new insights into the RB deficiency of PMNs of patients with alcoholic liver cirrhosis and reveals a rapamycin-aggravating effect on NOX2 activity as a consequence of the feedback inhibition of mTOR. NOX2, the motor system of phagocyte RB, is a potent source of ROS and plays a key role in phagocyte microbicidal activity. A deficient RB increased patients' susceptibility to bacterial infection.<sup>1</sup> ROS have also been involved in collagen synthesis,<sup>30</sup> liver injury, and fibrosis.<sup>31</sup> However, during the progression of liver cirrhosis, the patient's susceptibility to microbial infection increases, which represents a main cause of death in alcoholic cirrhosis.<sup>32</sup> In some reports, the defective microbicidal activity was associated with impaired RB,<sup>12</sup> but not in other studies in which RB was not changed or paradoxically increased.<sup>33</sup> These discrepancies may be the result of differences in the severity of the liver disease and/or methodological approaches (e.g., the use of the indirect methods to assess NOX2 activity, such as luminescence). In this study, RB of cirrhotic PMNs was studied using a specific assay for superoxide (cytochrome c) and revealed a severe dysfunction of NOX2 activity (Fig. 1), consistent with the weak RB observed in whole blood (Supporting Fig. 1). These data confirmed previous works,<sup>10,12</sup> although our healthy donors were younger ( $42 \pm 15$  years; female/male: 11:10) than patients ( $53 \pm 3$  years; female/male: 8:9; Table 1). This difference in age might contribute, in part, to the difference in neutrophil function between the two groups. However, the fifties of our controls (25%) did not show significant differences in their RB in whole blood, compared to younger subjects (data not shown). The RB defect was primarily associated with an impaired intracellular signaling toward NOX2 activation, because the fMLP-induced phosphorylation of p47phox(S345) and its effector, p38-MAPK,<sup>24,29</sup> was strongly decreased, whereas the amount of both proteins was unchanged. The biochemical origin of this deficiency is not known. However, a major upstream signaling effector leading to the activation of p38-MAP kinase by protein kinase C (PKC) (inositol-specific phospholipase C; PLC) was also impaired in fMLP-stimulated PMNs of patients with cirrhosis.<sup>34</sup> In PMNs, this PLC (PLC $\beta$ 2) is directly activated by the  $\beta\gamma$  subunits of a trimeric G protein (Gi) coupled to

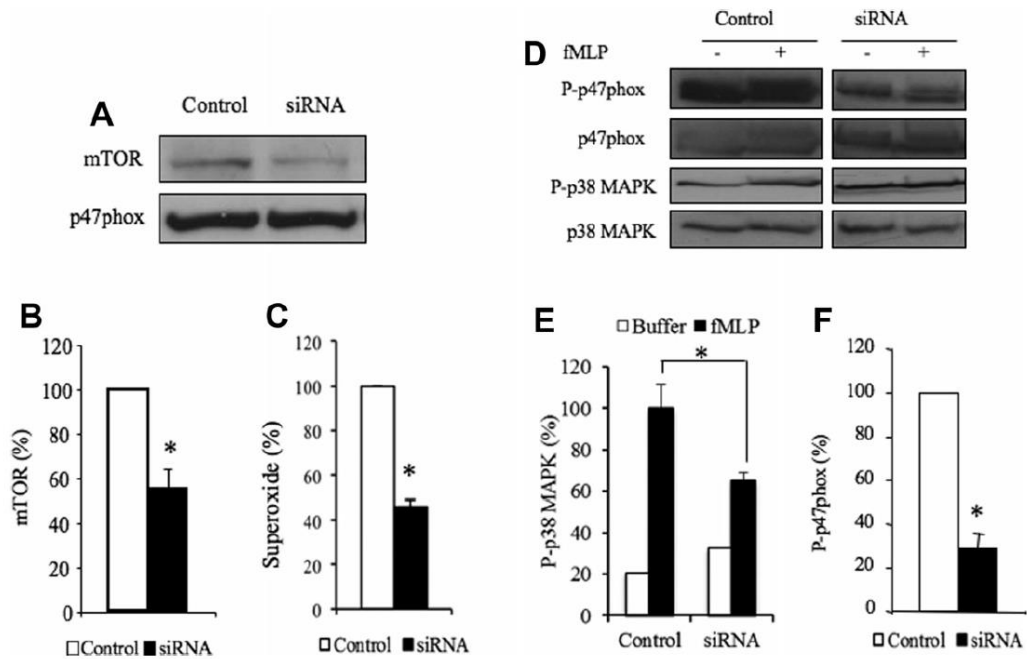


Fig. 5. mTOR depletion in neutrophil-like HL-60 cells inhibited fMLP-induced RB, phosphorylation of p38-MAPK, and p47phox. Differentiated HL-60 cells were transfected with mTOR siRNA oligonucleotides (100 nM; 4 days) or scramble RNA (control). mTOR expression was quantified (A) and is expressed as the percentage of control values (B) (n = 5 in each group; \*P < 0.05). P47phox was quantified to compare the amount of protein loaded. The RB of PMNs induced by fMLP (1  $\mu$ M) is expressed as the percentage of control values (C) (n = 5; \*P < 0.05; 100% = 6 nmole O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup> cells). The fMLP-induced (1  $\mu$ M; 90 seconds) phosphorylation of p38-MAPK (D and E) and p47phox (D and F) is expressed as the percentage of control values obtained with fMLP (n = 4 in each group; \*P < 0.05 versus control).

fPR1. The inability of cytochalasin B to potentiate the RB of cirrhotic PMNs (Fig. 1E) strongly suggests that biochemical alterations may affect cytoskeleton structures and alter early signaling events proximal to fPR1. The effect of mTOR inhibition on the RB of PMNs of patients with cirrhosis is not known and may have

clinical implications. Here, we show that rapamycin further aggravated the RB defect of PMNs from patients with cirrhosis (Fig. 2). The residual PMN production of ROS not inhibitable by rapamycin was very low, approximately 35% only of that of healthy PMNs (Fig. 2C). This amount of ROS is similar to that produced by

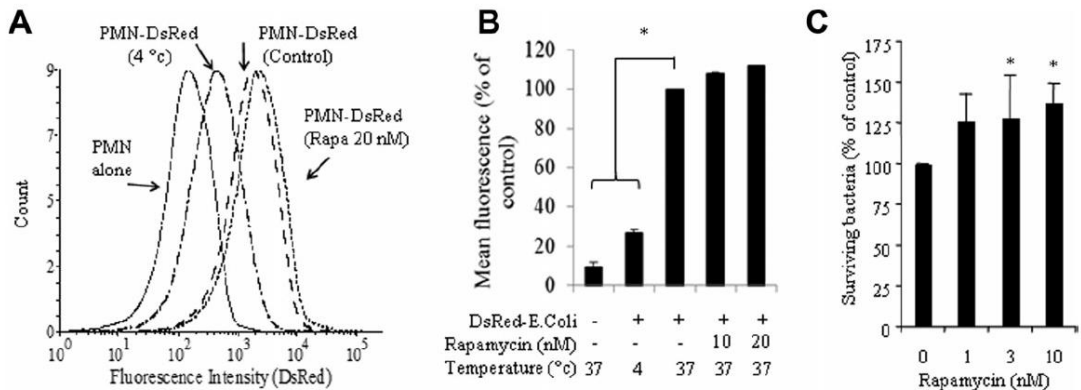


Fig. 6. Rapamycin inhibited PMN bactericidal activity, but not bacterial uptake. PMNs were treated at 37°C without (control) or with rapamycin (1-20 nM 25 minutes), then in the presence of DsRed-conjugated *E. coli* for 25 minutes. To estimate the amount of bacteria bound at the surface of PMNs, bacteria were incubated with PMN at 4°C. A representative quantification of the fluorescence intensity of PMN is shown in (A) (fluorescence-activated cell sorting analysis) and is expressed as the percentage of control values (B) (n = 6 in each group). The number of viable bacteria after incubation with PMN pretreated or not (control) with rapamycin (C) is expressed as the percentage of control values (n = 6-7 in each group; \*P < 0.05 versus control).



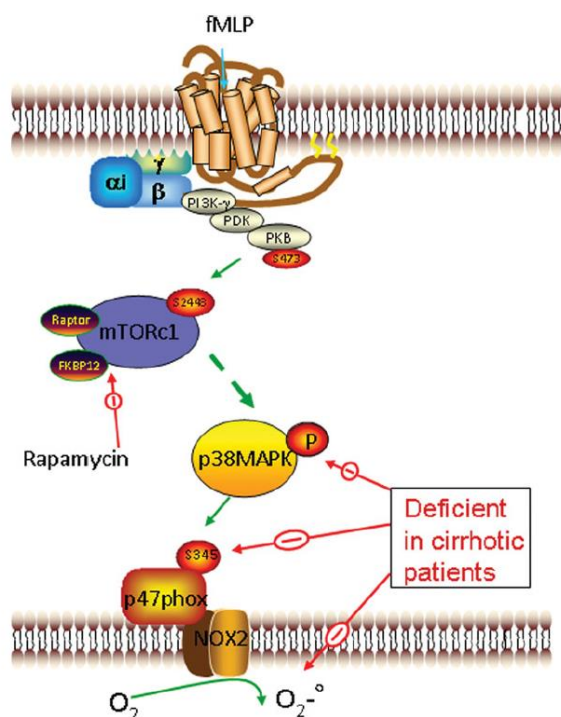


Fig. 7. Proposed model for the stimulation of RB by fMLP by the mTOR/MAPK-signaling pathway in human healthy and cirrhotic PMNs. Stimulation of PMNs by fMLP by its specific G-protein-coupled receptor (fPR1) induces a rapid activation of mTOR on Ser2448 through the AKT pathway. mTOR mediates the activation of p38-MAPK, which, in turn, phosphorylates p47phox on its Ser345 at the membrane and thus contributes to superoxide production by NOX2. In patients with cirrhosis, NOX2 activity is decreased as a result of a deficient activation of p38-MAPK and p47phox.

PMNs from patients with chronic granulomatous diseases,<sup>35</sup> which may contribute to the increased sensitivity of the patient to bacterial infections. Although one cannot exclude that the rapamycin-inhibitory effects described here could result from nonspecific effects, a role of mTOR to the NOX2 activation process was further confirmed by depletion of mTOR with siRNA (Fig. 5C) or antisense oligonucleotides (data not shown). Together, these results indicate that fMLP induced a rapid activation of mTOR (Fig. 2) involved in RB, which represents a novel function of mTOR in phagocyte oxygen-dependent defense systems, as supported here by the impaired bacterial killing induced by rapamycin (Fig. 6C).

The mechanism by which mTOR contributes to the PMN RB is not known. However, a possible model can be proposed based on the degree of inhibition of internal effectors induced by rapamycin (Fig. 7). Indeed, the rapamycin concentration that inhibits 50% of the fMLP-induced mTOR phosphorylation ( $IC_{50}$  of 3–5 nM; Fig. 2) was similar to that obtained for the phospho-p38-MAPK (Fig. 3E) and phospho-p47phox (Fig. 3C),

whereas that obtained for phospho-ERK was much higher ( $IC_{50}$  of 20 nM; Fig. 3F). These results suggest that mTOR preferentially induces the activation of p38-MAPK, which may, in turn, phosphorylate p47phox(S345). Whether mTOR activates p38-MAPK directly or indirectly by its upstream effector MEK3/6 remains to be elucidated. Interestingly, mTOR does not appear to regulate the translocation of both p38-MAPK and p47phox from the cytosol to the membranes (Figs. 4A,B and 5D,E). Thus, mTOR regulates the activation of NOX2 through the phosphorylation of its effectors, but not by the assembly process of the NADPH oxidase complex. Our data do not exclude the possibility that mTOR directly phosphorylated p47phox, NOX2, or other partners (p67phox and p40phox). Alternatively, mTOR may regulate other signaling effectors of the RB, such as PKC. Consistent with this hypothesis, we observed that the PKC-dependent phosphorylation site of p47phox (S320) induced by fMLP was also inhibited by rapamycin (data not shown). However, when PKCs were directly activated by phorbol myristate acetate, RB was not altered by rapamycin (Supporting Fig. 3C). Thus, mTOR antagonists should be useful to dissect the activation mechanism of NOX2 and to attenuate its hyperactivity in pathological situations. However, rapamycin may have detrimental effects in PMNs from immuno-depressed patients.

In conclusion, the use of the bacterial peptide, fMLP, as an inducer of RB of PMNs from patients with decompensated alcoholic cirrhosis reveals a strongly impaired NOX2 activity resulting from deficient signaling activities, leading to the phosphorylation of the NOX2 component, p47phox(S345), by p38-MAP kinases. The results further identify mTOR as a novel effector of RB of PMNs. Consequently, mTOR inhibition by rapamycin dramatically aggravated the RB defect of patients' PMNs. This rapamycin-induced inhibition of NOX2 activity in PMNs from patients with cirrhosis was mediated through inhibition of p38-MAPK signaling and phosphorylation of p47phox(S345). Therefore, the use of mTOR inhibitors may increase the susceptibility of patients with cirrhosis to bacterial infections. These results suggest that rapamycin or rapalogs should be used with caution in immuno-depressed patients.

**Acknowledgments:** The authors thank Margarita Hurtado-Nedelec, Anh Cung, Michèle Fay, and Célia Madjene for their help with flow cytometry and imaging studies.

## References

1. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16:42–47.



2. Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem* 1991;266:5911-5917.
3. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1383-1394.
4. Laurent A, Nicco C, Chereau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005;65:948-956.
5. Ramaiah SK, Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* 2007;35:757-766.
6. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Eng J Med* 2009;25:2758-2769.
7. Dominguez M, Miquel R, Colmenero J, Moreno M, Garcia-pagan JC, Bosch J, et al. Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2009;136:1639-1650.
8. Aram G, Potter JJ, Liu X, Wang L, Torbenson MS, Mezey E. Deficiency of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase enhances hepatocellular injury but attenuates fibrosis after chronic carbon tetrachloride administration. *HEPATOLOGY* 2009;49:911-919.
9. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, Burroughs AK. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246-1256, 1256.e1-5.
10. Ward PA. Role of C5 activation products in sepsis. *ScientificWorld Journal* 2010;10:2395-2402.
11. Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA, Jalan R. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *HEPATOLOGY* 2007;46:831-840.
12. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing, and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *HEPATOLOGY* 1986;6:252-262.
13. Juttner B, Younes A, Weissig A, Ahrens J, Becker T, Scheinichen D. Reduced post-operative neutrophil activation in liver transplant recipients suffering from post-hepatic cirrhosis. *Clin Transplant* 2009;23:921-929.
14. Ponziani F, Ojetti V, Tortora A, Di Maurizio L, Purchiaroni F, Gasbarini A. The metabolic and toxicological considerations for mTOR inhibitors in the treatment of hepatocarcinoma. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7:1535-1546.
15. Zhu AX. Molecularly targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma in 2012: current status and future perspectives. *Semin Oncol* 2012;39:493-502.
16. Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *HEPATOLOGY* 2007;46:1208-1217.
17. Mejias M, Garcia-Pras E, Gallego J, Mendez R, Bosch J, Fernandez M. Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension. *J Hepatol* 2010;52:529-539.
18. Liang W, Wang D, Ling X, Cao AA, Kong Y, Shang Y, et al. Sirolimus-based immunosuppression in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Liver Transpl* 2012;18:62-69.
19. Foster DA. Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:949-955.
20. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163-175.
21. Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002;10:457-468.
22. Nave BT, Ouwers M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999;344:427-431.
23. Djerdjouri B, Lenoir M, Giroud JP, Perianin A. Contribution of mitogen-activated protein kinase to stimulation of phospholipase D by the chemotactic peptide fMet-leu-Phe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:371-375.
24. Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Krovciarski Y, et al. A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 2006;116:2033-2043.
25. Paruch S, El-Benna J, Djerdjouri B, Marullo S, Perianin A. A role of p44/42 mitogen-activated protein kinases in formyl-peptide receptor-mediated phospholipase D activity and oxidant production. *FASEB J* 2006;20:142-144.
26. Patel S, Djerdjouri B, Raoul-Des-Essarts Y, Dang PM, El-Benna J, Perianin A. Protein kinase B (AKT) mediates phospholipase D activation via ERK1/2 and promotes respiratory burst parameters in formyl-peptide-stimulated neutrophil-like HL-60 cells. *J Biol Chem* 2010;285:32055-32063.
27. Stossel T. In: Gallin JI, Snyderman R, eds. *Inflammation*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999:661-679.
28. Liu L, Das S, Losert W, Parent CA. mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev Cell* 2010;19:845-857.
29. El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:6374-6378.
30. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *HEPATOLOGY* 1997;25:361-367.
31. De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 2006;131:272-275.
32. Linderth G, Jepsen P, Schonheyder HC, Johnsen SP, Sorensen HT. Short-term prognosis of community-acquired bacteremia in patients with liver cirrhosis or alcoholism: a population-based cohort study. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:636-641.
33. Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Frances R, Shah N, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:574-581.
34. Garfia C, Garcia-Ruiz I, Solis-Herruzo JA. Deficient phospholipase C activity in blood polymorphonuclear neutrophils from patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2004;40:749-756.
35. Babior BM, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease—pieces of a cellular and molecular puzzle. *Blood Rev* 1987;1:215-218.

## 2.2 Manuscrit 2 : L'élastase induit la diminution d'expression de la NADPH oxydase de neutrophiles de patients cirrhotiques. Restauration via l'activation du TLR8

### Elastase-mediated NADPH Oxidase depletion in neutrophils from immunodepressed cirrhotic patients and restoration via TLR8 activation

Loïc Rolas<sup>1,2,3</sup>, Abdelali Boussif<sup>1,2,3,4</sup>, Emmanuel Weiss<sup>1,2,3,5</sup>, Oualid Haddad<sup>6</sup>,  
Jamel El-Benna<sup>1,2,3</sup>, Richard Moreau<sup>1,2,3,7</sup>, Axel Périanin<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMRS-1149, Faculté de Médecine X. Bichat, 75018 Paris, France

<sup>2</sup>CNRS ERL 8252; Centre de Recherche sur l'Inflammation, 75018, Paris, France

<sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence INFLAMEX, 75018 Paris, France

<sup>4</sup>Université de Batna, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Algérie

<sup>5</sup>Département d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Beaujon, APHP, 92118 Clichy, France

<sup>6</sup>UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 93000, Bobigny, France.

<sup>7</sup>Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Unity, Service d'Hépatologie, Hôpital Beaujon, APHP, 92118, Clichy, France

*Running title: Neutrophil NADPH oxidase impairment and correction*

*\*Corresponding author:* INSERM 1149, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. Tel: (33)157277473; Fax: (33)157277411; Email: axel.perianin@inserm.fr

*Electronic word count: 7551*

*Number of figures and tables: 10 (9 figures + 1 table)*

*Abbreviations :* NOX2, NADPH oxidase 2; Phox, phagocyte oxidase; mTOR, mammalian target of rapamycin; fMLP, formyl-Met-Leu-Phe; MAPK, mitogen-activated protein kinases; ROS, reactive oxygen species; PMN, polymorphonuclear leukocytes; NEI, neutrophil elastase inhibitor.

*Keywords :* Host-defense; Cirrhosis, Hepatitis; Phagocytes; Proteases, NOXs, Degradation

*Conflict of interest:* Nothing to report

## Abstract (197 words)

Superoxide production by the NADPH oxidase 2 (NOX2) of neutrophils is required for efficient host-antimicrobial functions. In immuno-depressed patients, neutrophil defense activities are impaired. Despite important clinical implications, the mechanism of neutrophil impairment is unknown. We show here that the depressed superoxide production by neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis, was associated with impaired expression of the two transmembrane proteins of the catalytic core flavocytochrome b558 (gp91<sup>phox</sup>/NOX2 and p22<sup>phox</sup>), its cytosolic partner p47<sup>phox</sup> and mTOR. An extensive NOX2 depletion was induced in healthy neutrophils with purified elastase, by the bacterial derived fMLP peptide or with degranulation supernatants in an elastase-dependent manner. Moreover, plasma from patients but not control, inhibited NOX2 activity and expression of neutrophils in an elastase-dependent manner. Interestingly, NOX2 activity was restored by a TLR7/8 agonist in patients' neutrophils and whole blood, via a process involving transcription and mTOR-dependent synthesis of NOX2.

Thus, this study reveals an unexpected extensive NOX2 degradation mediated by elastase in plasma of alcoholic cirrhotic patients and by bacterial peptide stimulation of neutrophils. The deficient NOX2 activity can be corrected through de novo NOX2 synthesis induced by a TLR7/8 agonist, which opens novel perspectives to treat bacterial infection in immuno-depressed patients

## Introduction

Polymorphonuclear leucocytes (PMN) represent the first line of cellular defense against bacterial infection (Babior, 2004) and play an important role in innate immunity and inflammation. Efficient antibacterial neutrophil function requires a massive production of reactive oxygen species (ROS) via the plasma membrane superoxide-generating NADPH oxidase 2 (NOX2), a phenomenon termed respiratory burst (RB). NOX2 activation requires the formation at the plasma membrane of a multiprotein complex which contains the catalytic core flavocytochrome b558 consisting in two transmembrane proteins, gp91<sup>phox</sup> (NOX2) and p22<sup>phox</sup>, and cytosolic interacting components, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> and Rac1/2 (Babior, 2004; Lambeth, 2004; Bedard and Krause, 2007). Upon neutrophil stimulation by particles or soluble pro-inflammatory agents, cytosolic components are subjected to modifications by various signaling effectors, and translocate to the plasma membrane to form an active complex in which NOX2 reduces oxygen to superoxide anion at the expense of NADPH. Hydrogen peroxide derived from superoxide dismutation is used by

peroxidases particularly myeloperoxidase to efficiently eliminate bacteria (Nathan, 2002; Klebanof, 2005). A classical example of the biological importance of NADPH oxidase in host-defense is provided by an inherited genetic disorder, chronic granulomatous disease (CGD) characterized by the failure of superoxide production by phagocytes, resulting in a marked increase in the susceptibility of affected patients to bacterial and fungal infections (Babior, 2004). This pathology is due to multiple mutations affecting NADPH oxidase components, particularly NOX2 (Babior 2004).

Deficient production of superoxide by neutrophils also occurs in various non-inherited diseases in which biochemical alterations nonspecifically affected various types of cells and biological functions (Dinauer, 2014 ; Kruger et al., 2015 ; Doward et al., 2015). One typical example of severe neutrophil dysfunctions resulting from induced pathologies is illustrated by liver cirrhosis particularly alcohol cirrhosis which is a consequence of alcohol abuse. This pathology combines different states of the liver disease including steatosis, inflammation, necrosis and fibrosis (Naveau, 2006; Ceni et al., 2014) and represents a

major cause of mortality worldwide with an estimated 3.8% of all global death (Rehm et al., 2009). Cirrhosis is associated with immune dysfunctions and the inability of host-defense systems to protect against infections (Albilos et al., 2014). Another common complication of cirrhosis is the development of sepsis which is a major cause of death (Rehm et al., 2009; Arvaniti et al., 2010). Neutrophils have a dual role in cirrhosis. They contribute to the pathogenesis of cirrhosis through induction of liver injury in animal models (reviewed in Ramaiah and Jaeschke, 2007) as well in patients with alcoholic steatohepatitis (Lucey et al., 2009). Direct evidence for a role of neutrophils inducing liver injury is provided by the observation of an intracellular oxidant stress in hepatocytes during neutrophil attack (Jaeschke et al. 1999). However, the notion that neutrophils are systematically deleterious is not universally recognized. Indeed, it has been proposed that the higher neutrophil liver infiltration the better the prognosis (Altamirano et al., 2014). Neutrophil may exert beneficial effects through production of hepatocyte growth factor (Taieb et al., 2002), collagen degradation (Harty et al., 2010) or through granulopoiesis following G-CSF treatment (Eash et al., 2009). Moreover, there is at least one study showing that G-CSF therapy is beneficial in patients with severe alcoholic hepatitis (Singh et al., 2014). Finally, G-CSF therapy was found to improve survival in patients with acute-on-chronic liver failure, the most severe complication of cirrhosis (Garg et al. 2012). Although medical treatments exist to improve survival, about 35 % of patients die within six months (Moreau and Rautou, 2014).

Of the numerous circulating host defenses available, neutrophil defense activities such as ROS production and microbicidal activity are impaired in cirrhotic patients (Feliu et al., 1977; Rajkovic and Williams, 1986; Lebrun et al., 1992; Garfia et al. 2004; Panasiuk et al., 2005; Mookerjee et al., 2007; Stadlbauer et al., 2008; Ward, 2010; Markwick et al., 2015). The molecular basis of neutrophil impairment by cirrhosis

remains largely unknown, although a deficient signaling by receptors for bacterial peptides, fPR, was observed (Garfia, 2004, Rolas et al., 2013). Recently, with neutrophils from patients with decompensated alcohol cirrhosis, we reported a dramatic impairment of signaling pathways towards p47<sup>phox</sup> phosphorylation and ROS production mediated via fPR activation by the bacterial-derived peptide fMet-Leu-Phe (fMLP). The deficient ROS production was further aggravated by rapamycin pointing to an emerging role of mTOR in NADPH oxidase regulation (Rolas et al., 2013). Whether the deficient NADPH oxidase activity also involved altered expression of its components is unknown and is of interest given the pleiotropic biological functions of mTOR, particularly in protein synthesis (Laplanche and Sabatini, 2013).

In this study, we took advantage of these neutrophils from patients with advanced alcoholic cirrhosis to further investigate the expression of NADPH oxidase components and mTOR. Western-blot analyses reveal a marked depletion of the two transmembrane proteins of catalytic core flavocytochrome b558 (gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup>), p47<sup>phox</sup> and mTOR. Unexpectedly, an extensive depletion of gp91<sup>phox</sup> by degradation can be induced in healthy neutrophils by purified elastase or by the bacterial stimulating peptide fMLP or patient plasma, in an elastase-dependent manner. Interestingly, the deficient NOX2 expression and activity in patients' PMN was corrected by a TLR8 agonist which induced *de novo* synthesis of NOX2, which opens therapeutic perspectives.

## Results

### **1-The impaired production of superoxide by neutrophils from patients with alcoholic liver cirrhosis is associated with a deficient expression of Gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> but not p67<sup>phox</sup>.**

The production of superoxide by stimulated neutrophils requires the formation of an active multiprotein membrane complex,

NADPH oxidase, which comprises the catalytic core flavocytochrome b558 containing two transmembrane proteins, gp91<sup>phox</sup>(NOX2) and p22<sup>phox</sup>, and interacting cytosolic components among which p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup>. We recently showed that neutrophils from patients with decompensated alcohol cirrhosis exhibited a depressed superoxide production, as confirmed here with a new cohort of patients, which was associated with deficient p47<sup>phox</sup> phosphorylation (Rolas et al. 2013). To further examine the molecular basis this deficiency, the expression of NADPH oxidase components was analyzed by western-blot. Compared to control, patients' neutrophils exhibited a severe depletion of gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> (Fig.1B and D). The expression of p47<sup>phox</sup> was reduced at a lower extent, while p67<sup>phox</sup> expression was unaltered (Fig.1C). The depletion of gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> does not appear to result from altered neutrophil transcriptional activity since the amount of gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> mRNA was not modified (Fig.1E).

## **2- NOX2 depletion occurs in healthy neutrophils upon stimulation by formylpeptide.**

To further explore the mechanisms of NOX2 depletion in neutrophils, we examined whether NADPH oxidase components are subjected to down-regulation processes following cell stimulation. Treatment of healthy neutrophils with the bacterial stimulating peptide f-Met-Leu-Phe (fMLP) reveals that NOX2 expression decreased gradually as a function of time of stimulation, reaching about 40% of control values at 30-45min (Fig. 2B). By contrast, the expression of immunoreactive gp91<sup>phox</sup> fragments of approximately 28kDa (Fig. 2C) and 22 kDa increased, which is consistent with a proteolytic degradation of NOX2 induced by fMLP. The expression of p22<sup>phox</sup> also decreased significantly but at a lesser extent and at later times only (Fig. 2D). By contrast, the expression of p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> remained unaltered (Fig. 1E and F). The NOX2 degradation in PMN was observed at physiological fMLP concentrations but was

not detectable under conditions of low stimulation by fMLP (Figure S1).

The observation that only the two transmembrane proteins but not cytosolic components of the NADPH oxidase were subjected to downregulation suggested that a degradation process may be initiated in the extracellular medium, possibly due to proteases released during degranulation. To explore this hypothesis, cell-free degranulation supernatants were prepared from fMLP-stimulated PMN and incubated with a plasma membrane preparation obtained with resting PMN. This treatment confirmed a rapid and time-dependent degradation of NOX2 (Fig. 3A and B) which was similar to that observed with intact PMN (Fig. 2A). By contrast, the expression of p22<sup>phox</sup> in the cell-free system was not significantly altered (Fig. 3A and B). A role of proteases in the depletion of NOX2 was further suggested by the observation heat-denatured degranulation supernatants became inactive (Fig. 3C).

## **3- A major role of elastase in mediating NOX2 degradation in PMN**

To identify proteases potentially involved in NOX2 degradation, the gp91<sup>phox</sup> sequence was subjected to *in silico* analysis using the MEROPS database (Rawlings et al 2014). Amongst the five candidates detected (Table S1), elastase was the unique neutrophil protease identified. To examine its potential contribution in gp91<sup>phox</sup> degradation, healthy neutrophils were incubating with purified elastase (1 and 5 units) for 1H at 37°C. This treatment caused gp91<sup>phox</sup> degradation by approximately 50%, which was accompanied with an increase of immunoreactive gp91<sup>phox</sup> fragments (Fig.4A). A degradation of p22<sup>phox</sup> was observed with 5 units elastase (Fig. 4B). Moreover, a role of elastase in the degradation of gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> induced by fMLP is supported by the observation that neutrophil pretreatment with the neutrophil elastase inhibitor (NEI) prevented the fMLP-induced degradation of both components (Fig. 4C and D). To further determine if the

gp91<sup>phox</sup> degradation process in PMN is initiated in the extracellular medium, a cell-free supernatant of degranulating PMN was incubated with a new batch of resting PMN. This treatment also depleted gp91<sup>phox</sup>, increasing the amount of gp91<sup>phox</sup> fragments (Fig. 4E). A role of elastase in this effect is supported by the observation that PMN pretreatment with NEI blocked gp91<sup>phox</sup> degradation.

The above results strongly suggest that elastase released from primary granules during PMN stimulation mediates a gp91<sup>phox</sup> degradation process, directly or indirectly. To examine a possible degradation of external portions of gp91<sup>phox</sup> by elastase, we took profit of the anti gp91<sup>phox</sup> antibody 7D5 (Nakamura, 1987) which recognizes external gp91<sup>phox</sup> epitopes and surface plasmon resonance (SPR) phenomenon technology, to monitor the interaction between intact PMN and the 7D5 antibody coated on the sensor chip. As shown in Figure 5, injection of untreated PMN (control) resulted in a specific linear and time-dependent interaction with the 7D5 antibody. By contrast, the binding of elastase-pretreated PMN was markedly reduced in time and intensity. A reduced interaction was also detected with PMN pretreated with a degranulating supernatant. These data are consistent with alterations of external epitopes and expression of gp91<sup>phox</sup> at the surface of PMN.

#### **4- Functional alteration of neutrophils induced by plasma of patients with alcohol cirrhosis.**

Granulocyte elastase is released during infectious processes and its measurement has been proposed to be helpful for the diagnosis of patients with spontaneous bacterial peritonitis (Casafon et al., 1999). However, the relevance of plasma elastase in defense functions of neutrophils remains unknown. The amount of elastase in the plasma of the cirrhotic patients studied here was examined by western-blot analyses and was significantly higher than that of healthy subjects (Figure S2), in agreement with other works (Stanley et al., 1996). To examine

whether this elastase regulates the expression of gp91<sup>phox</sup> and activity, healthy PMN were treated for 12H in the absence or presence of plasma of patients or healthy donors, and washed twice. This treatment reveals that patients' but not control plasmas decreased the amount of positive cells labeled with the 7D5 gp91<sup>phox</sup> antibody, and surface expression of gp91<sup>phox</sup> (Fig. 6A and B). Moreover, this diminution was prevented by the elastase inhibitor NEI, strongly suggesting a contribution of patients' elastase in the gp91<sup>phox</sup> depletion. Consistent with this observation, patients' plasmas also inhibited NOX2 activity of PMN measured by the cytochrome C assay (Fig. 7A and B) and by chemiluminescence (Fig. 7D and E). In addition, the pretreatment of plasma and PMN with NEI prevented the inhibitory effects of patients' plasma (Fig. 7A, C, D and F).

#### **5- The deficient NOX2 expression and activity of neutrophils from cirrhotic patients can be restored with a TLR7/8 agonist.**

We previously reported that the defective production of superoxide by PMN from cirrhotic patients was associated with a deficient phosphorylation of the NOX2 component p47<sup>phox</sup> by MAP-Kinases (Rolas L et al., 2013). MAP-Kinases also transduce signaling of numerous transmembrane receptors of the innate immunity such as Toll-Like receptors (Takeda and Akira, 2005). Neutrophils expressed intracellular TLR8 and its activation leads to a low stimulation of neutrophils functions (Janke et al., 2009). Based on these findings and the observation that the TLR7/8 agonist CL097 potentiated fMLP-induced ROS production of healthy PMN (Makni-Maalej et al., 2012), we examined whether CL097 improves NOX2 expression and activity in cirrhotic patients' PMN. Treatment of purified patients' PMN with CL097 alone stimulated a production of gp91<sup>phox</sup> mRNA (Fig. 8A) and increased its expression as determined by western-blot analyses (Fig. 8B). CL097 also stimulated a weak production of ROS detected by cytochrome C (fig. 8C) and chemiluminescence (fig 8D), which reached

almost normal levels, as observed in healthy neutrophils. Interestingly, the ability of CL097 to restore fMLP-induced NOX2 activity of PMN was also observed in whole blood from patients (Fig.8E, right panel), suggesting potential clinical perspectives.

## 6- Involvement of mTOR in the restoration of NOX2 induced by the TLR7/8 agonists.

mTOR is a key signaling effector involved in various vital cellular functions (Lapalante and Sabbatini, 2013). In human neutrophils, mTOR is rapidly activated upon cell stimulation by fMLP and regulates the activation of p38-MAPK/p47<sup>phox</sup> phosphorylation leading to NOX2 activity (Rolas et al., 2013). In neutrophils from cirrhotic patients, the inhibition of mTOR by rapamycin aggravates the deficient production of ROS (Rolas et al., 2013). We show here that the expression of mTOR in these patients' neutrophils was strongly deficient (Fig. 9A and B), which may explain in part the deficient signaling activation towards NOX2 activity. To further examine whether mTOR also regulates the expression of NOX2 and its restoration (Fig. 8C-E), PMN were treated with rapamycin to block mTOR activation (Rolas et al, 2013). This treatment inhibited basal expression of NOX2 (Fig. 9C) which suggests that NOX2 is constitutively expressed. Rapamycin also prevented the CL097-induced increased NOX2 expression in PMN (Fig. 9C). Finally, CL097 was found to stimulate the production of gp91<sup>phox</sup> mRNA (Fig. 9D). These data are consistent with a major role of mTOR in the restoration of NOX2 expression mediated through TLR7/8 activation.

## Discussion

Neutrophils dysfunction is a current characteristic of immuno-depressed cirrhotic patients particularly with those with severe liver dysfunctions, which can lead to increased patients' susceptibility to bacterial infection and sepsis (Rehm et al., 2009;

Arvaniti et al., 2010). Neutrophil impairment is well documented at the functional level with deficiencies affecting various defense activities such as production of ROS, phagocytosis, exocytosis or chemotactic migration (Feliu et al., 1977; Rajkovic and Williams, 1986; Lebrun et al., 1992; Garfia et al.2004; Panasiuk et al., 2005; Mookerjee et al.,2007; Stadlbauer et al.,2008;Ward, 2010; Markwick et al.2015). This study provides insights to signaling and molecular mechanisms of neutrophils dysfunctions mediated by alcohol cirrhosis and suggests that deficiencies are reversible. The strongly deficient formylpeptide-induced production of superoxide production by PMN from cirrhotic patients (Fig.1A) was previously shown to be associated with impaired activation of signaling events affecting phospholipase C (Garfia, 2004), MAP-kinases and phosphorylation of p47<sup>phox</sup> (Rolas et al., 2013). Data shown here further indicate a marked depletion of components of the superoxide-generating motor system including the two transmembrane proteins of the catalytic core flavocytochrome b558 (gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup>), p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup> but not p67<sup>phox</sup>. These results provide additional explanations to the deficient production of superoxide induced by fMLP (Fig.1A) and by other stimuli such as zymosan, TNF $\alpha$  or fluoride, an activator of trimeric G proteins (Garfia et al., 2004).

The depletion of NADPH oxidase components in patients' PMN may theoretically occur through a degradation process and/or their defective synthesis. To clarify this point, different approaches have been developed focusing on the expression of the main component of the NADPH oxidase, the flavocytochrome b558 (gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup>). Our results are strongly in favor of an extensive proteolytic degradation of NOX2 predominantly mediated by elastase but do not exclude alteration of translation in PMN from patients. The degradation of NOX2 is supported by the increase of immunoreactive gp91<sup>phox</sup> fragments, 28 kDa and 22 kDa, induced by fMLP which coincided with the disappearance of the mother band 91 kDa (Fig. 2A). Two



fragments of the same size were previously observed by Quinn et al after treatment of purified cytochrome b558 or PN membranes with the Staphylococcal V8 protease (Quinn et al, 1992). However, the pathophysiological relevance of cleavage was not so obvious. Our results show that the degradation of the gp91<sup>phox</sup> occurred with intact PN, under physiological conditions of stimulation with fMLP or in the presence of supernatants degranulation and results in a significant depletion of the NOX2 by at least 50%, which must have pathological consequences.

The degradation of gp91<sup>phox</sup> in PN was predominantly mediated by elastase, a major protease of PMN not only involved in the bactericidal activity of PN but also in immune responses (Dang, 2006; Meyer-Hoffert and Wiedow, 2010). This conclusion is supported by the following arguments. First, the fact that purified elastase induced a depletion of NOX2 (Fig. 4A) which was similar to that observed with fMLP-stimulated PMN. Second, the elastase inhibitor NEI completely prevented the degradation of the fMLP-induced NOX2 or the supernatant of degranulation (Fig. 4). Finally, purified elastase strongly inhibited the specific binding of gp91<sup>phox</sup> antibody to PMN (Fig. 5). This result can be explained by degradation of the epitope specifically recognized by the antibody 7D5 anti gp91<sup>phox</sup> and includes part of the 2nd and 3rd extracellular loop of NOX2 (Nakamura et al, 1987).

The cleavage sites of gp91<sup>phox</sup> by proteases are not known. However, in-silico analysis of potential sites for elastase (rq / LRI (V / t) n / rw) (Rawlings et al., 2014) provides 3 potential sites, around V90, Ile 160 and Thr269. One of these sites (V160) is actually located in the 2nd extracellular loop of gp91<sup>phox</sup> which is part of the epitope of the antibody 7D5, which would be consistent with the decreased binding of the 7D5 antibody to elastase-treated PMN (Fig. 5). In addition, the cleavage around V90 and T270 would generate a gp91<sup>phox</sup> fragment of about 22 kDa which contains the two hemes as initially identified (Quinn et al., 1997). In our model of the flavocytochrome b558

degradation induced by fMLP, the cleavage the gp91<sup>phox</sup> was rapid, detectable after 15min and is maximal at 30-45 min while degradation of p22<sup>phox</sup> was weak and observed at only 60 min. This time lag suggests that p22<sup>phox</sup> would not be a primary target of elastase that it does not really express extracellular portion. Furthermore, the observation that the elastase inhibitor NEI completely protects against its degradation and that of the gp91<sup>phox</sup>, suggests that the initial degradation of gp91<sup>phox</sup> would render p22<sup>phox</sup> unstable as suggested in other studies (Quinn et al., 1992), which then promote its degradation likely by intracellular proteases. A role of elastase intracellularly however remains not excluded since it has shown that neutrophil elastase penetrates epithelial cells and induces degradation of the CFTR via the activation of calpains (Le Gars et al, 2013). It is not known whether elastase is present in the cytosol of neutrophils. However, in leukemia cells the presence of neutrophil elastase was detected and was involved in the cleavage of the glucocorticoid receptor (Distelhorst et al, 1987).

The pathological consequences of NOX2 degradation turned out to be especially relevant in patients with decompensated alcoholic cirrhosis. In this pathology, the defective NOX2 activity of PMN was recently associated with an altered MAP-kinase signaling impacting p47 phosphorylation (Rolas et al., 2013), and previously to phospholipase C (PLC) impairment (Garfia, 2004). This study provides novel biochemical factors to this functional deficiency; particularly a deficient expression of p47<sup>phox</sup> and NOX2 (Fig 1A) and mTOR (Fig. 9) which is an emerging signaling effector for ROS production by PMN (Rolas 2013). In cirrhotic patients, the amount of elastase in patients' plasma is increased (Stanley et al., 1996), as confirmed in this study (Fig.S3). This is an indication that PN may have degranulated likely due to the presence of pro-inflammatory agents in patients' plasma (Mokerjee et al., 2007). This plasma elastase is apparently active, unlike the plasma of healthy individuals since treatment of healthy PMN with patients' plasma decreased the expression of gp91<sup>phox</sup>



and its catalytic activity (Fig.8). Remarkably, the elastase inhibitor completely prevented the inhibitory effects of patients' plasma suggesting a major contribution of the circulating elastase in these pathological effects. The mechanisms by which elastase alters PN in-vivo have not been analyzed in this study. In addition to a direct effect on elastase of gp91<sup>phox</sup>, as suggested by the inhibition of the 7D5 antibody binding to elastase-treated PN (Fig 5), elastase may act indirectly through alteration of other surface proteins and mediating desensitization processes. Indeed, PMN surface receptors such as PAR-R is cleaved and activated by elastase (Kanke et al., 2005). Furthermore, the elastase may also act as biased agonist of PAR-2 (Ramachandran et al., 2011) or TLR4 (Devaney et al., 2003), which can lead to desensitization of signaling pathways and inhibition of NOX2 / or the expression. Our results showing that the deficient expression of NOX2 in patients' PN can be corrected ex-vivo with agonist the TRL7/8 CL097, which sheds new insights to the regulation of the expression of NOX2 in PMN and provides therapeutic hope for patients. In resting PMN, gp91<sup>phox</sup> appears to be constitutively synthesized through a process involving mTOR as suggested by the inhibitory effect of rapamycin (Fig. 9C). In patients' PMN, the expression of mTOR is strongly deficient, which is consistent with the decreased expression of NOX2 resulting from its degradation mediated by elastase in the plasma. Treatment PMN with the agonist of TLR7/8 stimulated an increase in the gp91<sup>phox</sup> mRNA levels and restored its expression (Fig. 9) which is also dependent on mTOR. It remains unclear, however, whether CL097 promotes the activation of mTOR in PMN. Whatever the molecular mechanism of action of CL097, our results indicate that the deficit NOX2 expression and activity in cirrhotic patients PMN appears to be reversible not only in purified PMN but also in whole blood of patients (Fig. 8). These original findings thus open novel therapeutic insights to reduce the susceptibility of immunodepressed patients to bacterial infections. This perspective is further supported by previous works indicating that TLR7/8 agonists

promote lipid mediator biosynthesis (Hatterman et al., 2007) and neutrophil defense functions (Hayashi et al., 2003).

In conclusion, this study shows that the impaired capacity of ROS production by PMN from cirrhotic patients is associated with a deficient expression of components of the superoxide-generating motor NADPH oxidase, particularly affecting the catalytic core flavocytochrome b558. An unexpected extensive NOX2 degradation mediated by elastase in plasma of alcohol cirrhotic patients and by bacterial peptide stimulation of neutrophils was identified. The deficient NOX2 activity can be corrected through *de novo* NOX2 synthesis induced by a TRL7/8 agonist, which opens novel perspectives to treat bacterial infection in immunodepressed patients.

Acknowledgements. This work was supported by the Labex Inflamex (Fellowship to L.R.), INSERM and CNRS.

## Patients and methods

### *Reagents*

Four antibodies directed against gp91<sup>phox</sup> were used amongst which 3 from Santa Cruz (Heidelberg, German) i.e. mouse anti-gp91<sup>phox</sup> (54.1) sc-130543 ; goat anti-gp91<sup>phox</sup>(C-15) sc-5827; rabbit anti-gp91<sup>phox</sup> (H-60): sc-20782. The mouse anti-flavocytochrome b, FITC (Clone: 7D5) was from MBL (CliniScience, France). The rabbit anti-p22<sup>phox</sup> (FC-195): sc-20781 was from Santa Cruz (Heidelberg, German) and the rabbit anti-p67<sup>phox</sup>, and rabbit anti-p47<sup>phox</sup> were produced as described [Dang PMC, 2006]. The rabbit anti-mTOR (7C10) mAb 2983 was from Cell Signaling (Leiden, The Netherlands) and the anti-actin was from Millipore (Saint Quentin-en-Yvelines). The protease inhibitor cocktail was from Roche and the Restore western-blot stripping buffer was from Pierce. SDS-PAGE, western-blotting reagents were from BioRad (Marnes la Coquette, France) and Iblot nitrocellulose stacks from Life Technologies (Saint Aubin, France). CL097 was from InvivoGen (San Diego, USA). All other reagents were from Sigma.

### *Patients*

Patients' blood samples were obtained as previously described (Rolas et al., 2013). Briefly, patients were hospitalized in the Liver Unit of Beaujon Hospital (Clichy, France). Inclusion criteria were age over 18 years, biopsy-proven cirrhosis, and Child-Pugh class B or C cirrhosis. Patients had a history of excessive alcohol ingestion (50 g/day), but no other causes of liver disease. Viral serologies for hepatitis B virus and hepatitis C virus were negative. Alcohol consumption was stopped for at least 3 days. Clinical characteristics of patients are shown in Table 1. Exclusion criteria were evidence of recent gastrointestinal bleeding, current bacterial infections, treatment with corticosteroids, pentoxifylline or other immunosuppressive drugs in the past 30 days, and presence of hepatocellular carcinoma, other cancer, or human

immunodeficiency virus infection. Healthy subjects (controls) were hospital employee volunteers or obtained from the blood bank (EFS, Paris, France). This study was approved by our institutional review board, and written informed consent was obtained from all patients.

### *Purification of neutrophils*

Peripheral blood from healthy volunteers or cirrhotic patients was collected in EDTA-containing tubes. Neutrophils were purified by a first step sedimentation with 1% Dextran in saline followed by centrifugation on a cushion of Ficoll-Hypaque (400g-30 min). After mononuclear cells were aspirated, the wall of the tubes was wiped to further remove adherent mononuclear cells. Contaminating red cells were lysed under hypotonic conditions (30sec) (Rolas et al., 2013) and the purified neutrophils (97-98%) were washed twice and suspended in Hank's balanced salt solution (HBSS) at pH 7.4 and containing Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>.

### *Preparation of PMN membrane fractions*

PMN treated with di-isopropylfluorophosphate (DFP) for 15min were stimulated in HBSS with fMLP (1μM) for 2min and kept in ice. PMN were sonicated 2x15 sec in PBS containing a cocktail of antiproteases and membrane and cytosolic fractions of resting cells were prepared as described previously (Olson et al, 1991) by centrifuging the post nuclear supernatants (1000 g, 2 min, 4°C) over 15-35% sucrose gradient (120,000 g, 50 min, 4°C). Membranes were collected at the interface, washed by centrifugation (100,000 g, 1H, 4°C) and suspended in HBSS buffer. One volume of PMN membrane fraction (equivalent of 5 million cells) was incubated with one volume of a cell-free degranulation supernatants for 1H and complemented with 1,5X Laemmli buffer for western-blot analyses.

### *Respiratory burst (RB).*

PMN ( $1 \times 10^6$  cells/ml HBSS) were incubated at 37°C min before stimulation with fMLP. RB was continuously monitored by measuring the production of superoxide anion in the presence of 80  $\mu$ M cytochrome c, using a Perkin-Elmer Lambda 40 spectrophotometer equipped with thermostated (37°C) cuvette holder and magnetic stirrer (Rolas et al., 2013) or by the highly sensitive luminol-enhanced chemiluminescence assay with purified neutrophils ( $0.5 \times 10^6$  cells/450  $\mu$ l Hanks Balanced salt solution and with whole blood (20  $\mu$ l in 450  $\mu$ l PBS containing 0.120 mM calcium and 20mM luminol).

#### *Quantification of messenger RNA*

Total RNA was extracted from 5 millions neutrophils in 1 ml Trizol according to the manufacturer protocol and stored at -80°C until use. A quantitative real-time PCR (qPCR) was used to quantify relative messenger RNA (mRNA) of the genes of interest. Complementary cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g mRNA using 1 L OligodT and XXX reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The following sequence of DNA-oligos primers for qPCR were used : Gp91pox forward : TGTTCAGCTATGAGGTGGTGA, gp91<sup>pox</sup> reverse TCAGATTGGTGGCGTTATTG, p22<sup>pox</sup> forward : ACCGCCGTGGTGAAGCT, p22<sup>pox</sup> reverse: ACCGAGAGCAGGAGATGCA All real-time PCR reactions were performed using the Roche LightCycler 480 device and the CliniSciences Kapa Sybr Fast qPCR kit according to the manufacturer's protocol. Samples were run in duplicate, and the melting curve and melting peak were controlled for each primer pair. Relative expression levels for each gene were calculated using the  $2^{-\Delta Ct}$  method, with normalization to GAPDH. Results are representative of 3 to 4 independent experiments.

#### Western-blot analysis

Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 containing 2.5 mM orthovanadate, 2.5 mM EDTA, 5 M urea, 1 mM DTT, a cocktail of antiproteases (Complete<sup>TM</sup>, Roche) and 1X Laemmli sample buffer, and subjected to western-blotting experiments using standard protocols [8]. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody were used and visualized with enhanced chemiluminescence (ECL). Protein phosphorylation was quantified with the NIH Image J 1.62 software and expressed as a percentage of actin expression.

#### In Vitro Binding Assays on the Biacore.

The time course interaction of PMN with the NOX2 specific antibody bound to the sensor chip was assessed with a BIAcore X100 (GE Healthcare, Freiburg Germany). A CM3 sensorchip was used to couple the mouse antibody directed against the external portion of NOX2 (Clone: 7D5, MBL/Cliniscience), according to standard parameters providing by the « Mouse antibody capture Kit. PMN suspended in PBS were injected (10, 30 and 100  $\times 10^3$  cells in 150  $\mu$ l) at a flow rate of 30  $\mu$ l /min. The SPR response was recorded as a function of time and expressed in resonance units (RU).

#### *Expression of gp91pox at the surface of PMN.*

PMN ( $0.25 \times 10^6$  cells) were incubated in 50  $\mu$ l PBS containing sodium azide (0.05%), and the anti-gp91<sup>pox</sup> antibody coupled to FITC (2,5  $\mu$ g/50  $\mu$ l). Incubations was performed at 4°C with gentle agitation for 1 Hour. Cells were washed 3 times with PBS and subjected to FACS analysis (BD FACS Canto II).

#### *Statistical analysis.*

Unless otherwise stated, data represent means  $\pm$  SEM. Differences between means were identified using the Student's paired *t*-test or Mann-Whitney U test, with a threshold of  $P < 0.05$ . Statistically significant differences are designated by \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$ .

## Figure Legends

**Figure 1. Deficient expression of gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> but not p67<sup>phox</sup> in PMN from cirrhotic patients.** (A) PMN from healthy volunteers (control) and cirrhotic patients were stimulated with bacterial-derived peptide fMet-Leu-Phe (fMLP, 1μM) and the production of superoxide was quantified and expressed in nmole/10<sup>6</sup>cells (n=15, \*: P<0.05). (B and C) A representative western-blot analyses of the expression of gp91<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and actin in PMN from control and cirrhotic patients and quantification expressed as percentage of actin level (n=8). (D) A representative western-blot analysis of the expression of p22<sup>phox</sup> in control and patients' PMN and quantification expressed as percentage of the actin level (n=6). (E) Gene expression of gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> relative to GAPDH as internal control, in healthy and patients' PMN (n=6). A significant difference between mean values (±SEM) is indicated by \*, P<0.05, and \*\*P<0.01.

**Figure 2. A sustained stimulation of PMN induces the proteolytic degradation of gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> but not p67<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup>.** (A) Western-blot analyses of gp91<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> and actin in PMN from healthy volunteers which were stimulated for various times with fMLP (1μM). Blots are representative of at least 5 experiments and densitometric analyses are cumulative and expressed as percentage of the actin level. A significant difference between mean values ±SEM is indicated by \* P<0.05.

**Figure 3. Degradation of gp91<sup>phox</sup> in neutrophil membrane fractions induced by a degranulation supernatant from stimulated PMN.** (A) Immunoblot analysis of gp91<sup>phox</sup> and p21<sup>phox</sup> in the membrane fraction of healthy PMN treated in the absence (hanks) or presence of a cell-free

degranulation supernatant obtained from fMLP-stimulated PMN. Blots are representative of 4 experiments and densitometric analyses are cumulative and expressed as percentage of the actin level. A significant difference between mean values ±SEM is indicated by \* P<0.05.

**Figure 4. Neutrophil elastase induced the degradation of gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> in healthy PMN.** (A and B) Immunoblot analysis of gp91<sup>phox</sup> and p21<sup>phox</sup> in healthy PMN treated in the absence or presence of elastase at 1 and 5 units for 1 hour. (C and D) Immunoblot analysis of gp91<sup>phox</sup> and p21<sup>phox</sup> in healthy PMN treated in the absence or presence of the elastase inhibitor (NEI) at 100μM for 15 min before stimulation with fMLP (1μM) for 45min. (E) Immunoblot analysis of gp91<sup>phox</sup> in healthy PMN pretreated in the absence or presence of the elastase inhibitor (NEI) at 100μM for 15 min before treatment for 45min with a cell-free degranulation supernatant obtained from fMLP (1μM, 2min) stimulated PMN. Blots are representative of 4 experiments and densitometric analyses are cumulative and expressed as percentage of the actin level. A significant difference between mean values ±SEM is indicated by \* P<0.05, and \*\*P<0.01.

**Figure 5. Specific binding of neutrophils to the sensor-chip-coated anti-NOX2 antibody and its alteration induced by elastase and a degranulation supernatant.** (A) Sensorgrams of the binding and dissociation of PMN to the anti-gp91<sup>phox</sup> antibody coated to the CM3 sensorchip as a function of time. Three groups of PMN were injected (10<sup>3</sup> cells in 150 μl PBS); Control PMN and PMN treated with elastase (5units) or with a cell-free degranulation supernatant. Data are representative of 3 independent experiments are expressed as resonance unit (RU). Bars represent the maximal values from the representative experiment, obtained before regeneration.

**Figure 6 : Plasma from cirrhotic patients reduced gp91<sup>phox</sup> expression at the plasma membrane of healthy PMN in NEI-dependent manner.** (A) FACS analysis of the expression of gp91<sup>phox</sup> at the surface of healthy PMN treated with plasma of healthy and patients PMN, in the absence or presence of the elastase inhibitor NEI (100µM). Data of the left panel represent the percentage of positive cells labeled with the anti-gp91<sup>phox</sup> FITC-coupled antibody (7D5). The right panel gives the MFI values (mean ± SEM) expressed as percentage of control values (n=5 separate experiments). A significant difference between groups is indicated by \* P<0.05, and \*\*P<0.01. (B and C) Flow cytometry histograms showing gp91<sup>phox</sup> expression at the surface of control and treated PMN stained with the anti-gp91<sup>phox</sup> FITC-coupled antibody.

**Figure 7: Plasma from cirrhotic patients reduced the PMA-induced ROS and superoxide production of healthy PMN in NEI-dependent manner.** (A-C) : PMA induced production of superoxide by healthy PMN which have been pretreated for 12H in the absence (RPMI) or presence of plasma from healthy volunteers and cirrhotic patients, either with or without 100µM NEI. After treatment, PMN were washed and the production of superoxide was measured after 12 min stimulation with phorbol myristate actate (PMA, 100 nM (panel B and C). Data in panel A represent the production of superoxide expressed as percentage of control values (mean ± SEM, n=5). (D-F) represent the production of ROS of PMN measured by the chemiluminescence and expressed as percentage of control values. A significant difference between mean values is indicated by \* P<0.05, and \*\*P<0.01.

**Figure 8 : The TLR7/8 agonist CL097 restored NOX2 expression in neutrophils from cirrhotic patients and fMLP-induced ROS production in PMN and in whole blood.**

(A) Neutrophils from cirrhotic patients were treated in the absence (buffer) or presence of CL097 (2.5 µg/ml) for 30 min at 37°C and the amount of Gp91<sup>phox</sup> mRNA was quantified and expressed as percentage of control (Buffer) (n=6, \*: P<0.05). (B) The expression of Gp91<sup>phox</sup> was determined by western-blot assays and expressed as percentage ±SEM of that of neutrophils of healthy donors (Panel B, n=5, \*:P<0.05). (C) Neutrophils from healthy donors and patients with advanced alcoholic cirrhosis were treated for 15 min with the TLR7/8 agonist (2.5 µg/ml), then with 1 µM fMLP. Results represent the mean of superoxide production ±SEM expressed in nmole/10<sup>6</sup> cells (n=8, \*: P <0.05). (D) ROS production was measured by the highly sensitive luminol-enhanced chemiluminescence assay with purified neutrophils (0.5x10<sup>6</sup> cells/450µl Hanks Balanced salt solution. (E) ROS production was measured by chemiluminescence in whole blood from cirrhotic patients. Cells were treated for 15 min with the TLR7/8 agonist alone (Buffer), then with 1 µM fMLP (Panel A). Results represent the peak of chemiluminescence response expressed in cpm, and are representative of 6 experiments.

**Figure 9. The TLR7/8 agonist stimulates gp91<sup>phox</sup> expression in patient's PMN in Rapamycin-dependent manner.** (A) A representative western-blot analysis of the expression of mTOR and actin in PMN from control and cirrhotic patients, and (B) quantification expressed as percentage of actin level (n=14). (C) Expression and quantification of gp91<sup>phox</sup> in patients' PMN pretreated with the mTOR antagonist rapamycin (10 nM) for 15min followed by treatment with CL097 (2.5 µg/ml) for 1H at 37°C. Data represent the mean± SEM of 5 experiments with CL097 and 2 experiments with rapamycin. A significant difference between group of values is indicated by \*P<0.05.

**Supplemental data.**

Figure legends for supplemental data are provided with the figures

## REFERENCES

- Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61:1385-1396.
- Altamirano J, Miquel R, Katoonizadeh A, Abraldes JG, Duarte-Rojo A, Louvet A et al. A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2014;146:1231-1239.
- Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246-1256.
- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16:42-47.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313. Review.
- Casafont F, Rivero M, Fernandez MD, Crespo J, Fabrega E, Sánchez E, Pons-Romero F. Granulocyte elastase in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci.* 1999 Oct;44(10):1985-9.
- Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol* 2014;20:17756-17772.
- Devaney, J.M., Greene, C.M., Taggart, C.C., Carroll, T.P., O'Neill, S.J., and McElvaney, N. G. (2003) Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 544, 129–132
- Dinauer MC. Disorders of neutrophil function: an overview. *Methods Mol Biol* 2014;1124:501-515.
- Distelhorst CW, Janiga KE, Howard KJ, Strandjord SE, Campbell EJ. Neutrophil elastase produces 52-kD and 30-kD glucocorticoid receptor fragments in the cytosol of human leukemia cells. *Blood.* 1987 Sep;70(3):860-8.
- Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG. The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function during Acute Inflammation. *Am J Pathol* 2015;185:1172-1184.
- Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 2009;113:4711-4719.
- Feliu E, Gougerot MA, Hakim J, Cramer E, Auclair C, Rueff B, et al. Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 1977;7:571-577.
- Garfia C, Garcia-Ruiz I, Solis-Herruzo JA. Deficient phospholipase C activity in blood polymorphonuclear neutrophils from patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2004;40:749-756.
- Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology* 2012 ;142:505-512.
- Harty MW, Muratore CS, Papa EF, Gart MS, Ramm GA, Gregory SH, et al. Neutrophil depletion blocks early collagen degradation in repairing cholestatic rat livers. *Am J Pathol* 2010;176:1271-1281.
- Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J.* 2007 May;21(7):1575-85. Epub 2007 Jan 30.
- Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003 Oct

1;102(7):2660-9. Epub 2003 Jun 26.

Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A. Glutathione peroxidase deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 1999;29: 443-445.

Janke M<sup>1</sup>, Poth J, Wimmenauer V, Giese T, Coch C, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1026-33.

Kanke,T.,Takizawa,T.,Kabeya,M.,and dKawabata,A.(2005) Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2 as a potential therapeutic target. *J. Pharmacol. Sci.* 97, 38 – 42

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005;77: 598 – 625

Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004651.

Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):181-9.

Laplanche M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci*. 2013 Apr 15;126(Pt 8):1713-9. doi: 10.1242/jcs.125773.

Le Gars M, Descamps D, Roussel D, Saussereau E, Guillot L, Ruffin M, Tabary O, Hong SS, Boulanger P, Paulais M, Malleret L, Belaaouaj A, Edelman A, Huerre M, Chignard M, Sallenave JM. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jan 15;187(2):170-9. doi:

10.1164/rccm.201205-0875OC. Epub 2012 Dec 6.

Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P, Etienne JP. Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol* 1992;16:98-101.

Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Eng J Med* 2009;25:2758-2769.

Makni-Maalej K, Boussetta T, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. The TLR7/8 agonist CL097 primes N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: critical role of p47<sup>phox</sup> phosphorylation and the proline isomerase Pin1. *J Immunol* 2012;189:4657-4665.

Meyer-Hoffert U, Wiedow O (2010) Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. *Curr Opin Hematol*. PubMed: 21042214

Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology* 2007;46:831-840.

Moreau R, Rautou PE. G-CSF Therapy for Severe Alcoholic Hepatitis: Targeting Liver Regeneration or Neutrophil Function?. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1424-1426.

Nakamura M, Murakami M, Koga T, Tanaka Y, Minakami S. Monoclonal antibody 7D5 raised to cytochrome b558 of human neutrophils: immunocytochemical detection of the antigen in peripheral phagocytes of normal subjects, patients with chronic granulomatous disease, and their carrier mothers. *Blood*. 1987 May;69(5):1404-8.

Nathan C. Points of control of inflammation. *Nature*. 2002;420:846 – 852.

Naveau S. Current trend: alcoholic liver diseases. *Gastroenterol Clin Biol*

2006;30:550-553.

Olson, S. C., Bowman, E. P., and Lambeth, J. D. (1991) Phospholipase D activation in a cell-free system from human neutrophils by phorbol 12-myristate 13-acetate and guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate). Activation is calcium dependent and requires protein factors in both the plasma membrane and cytosol. *J. Biol. Chem.* 266, 17,236–17,242

Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D, Zak J, et al. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:7661-7665.

Pham CT (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 6: 541-550. doi:10.1038/nri1841. PubMed: 16799473.

Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ. Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J Biol Chem.* 1992 Apr 15;267(11):7303-9

Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing, and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986;6:252-262.

Ramachandran,R.,Mihara,K.,Chung, H.,Renaux,B.,Lau,C.S.,Muruve, D. A., DeFea, K. A., Bouvier, M., and Hollenberg, M. D. (2011) Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2(PAR2). *J. Biol. Chem.* 286, 24638–24648

Ramaiah SK, Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute

inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* 2007;35:757-766.

Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2014) *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 42, D503-D509.

Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* 2009;373:2223-2233.

Singh V, Sharma AK, Narasimhan RL, Bhalla A, Sharma N, Sharma R. Granulocyte colony-stimulating factor in severe alcoholic hepatitis: a randomized pilot study. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1417-1423.

Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA, Jalan R. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2008;48:945-51.

Stanley AJ, MacGregor IR, Dillon JF, Bouchier IA, Hayes PC. Neutrophil activation in chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996 Feb;8(2):135-8.

Taïeb J, Delarche C, Paradis V, Mathurin P, Grenier A, Crestani B, et al. Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2002;36:342–348.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005 Jan;17(1):1-14.



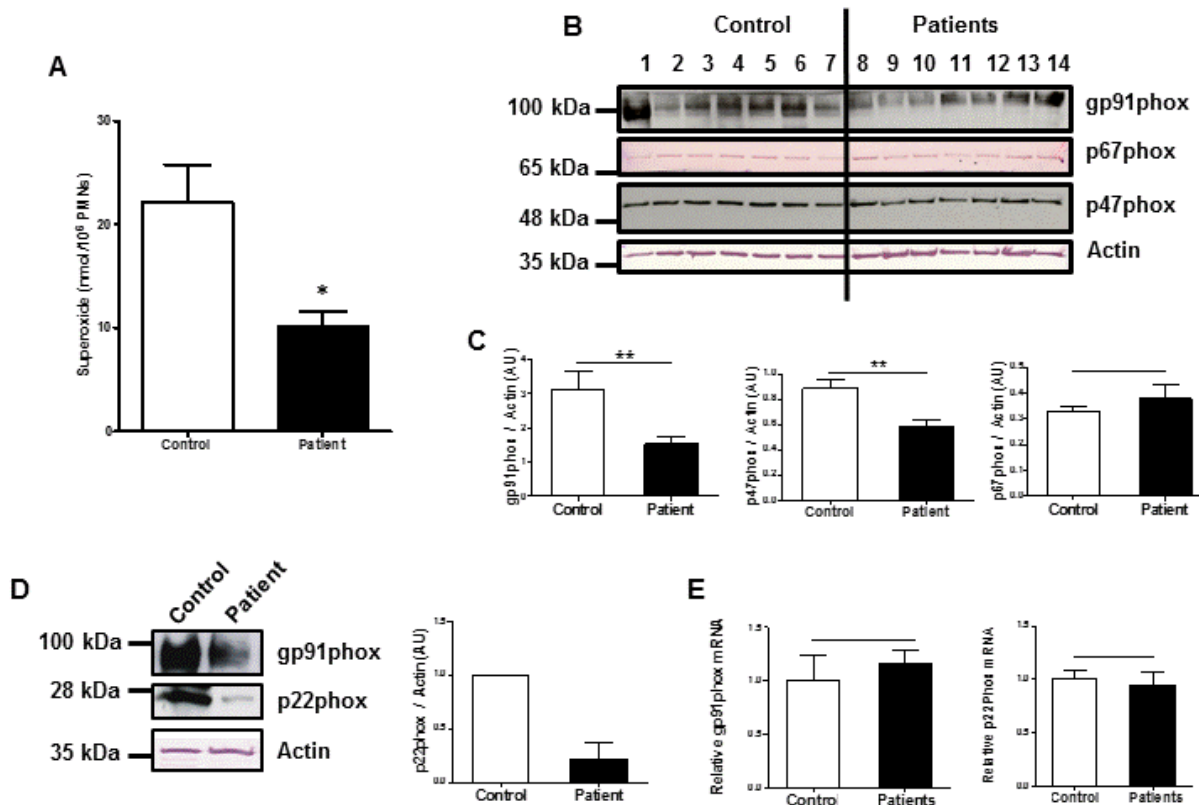
**Table 1. Characteristics of Patients**

Variable	
Number of Patients	34
Age, years	57.8 ± 1.4
Female/male	5/29
Ascite, n (%)	30 (88)
HCC, n (%)	0 (0)
Encephalopathy, n (%)	13 (38)
Serum albumin, g/L	25.24 ± 1.06
Serum bilirubin, µmol/L	117.6 ± 20.7
Prothrombin ratio, %	47.71 ± 2.61
INR (sec)	1.73 ± 0.08
Serum creatinine, µmol/L	92.48 ± 11.84
Child-Pugh Score	10.66 ± 0.27
Child-Pugh class C, n (%)	28 (82)
MELD score	19.29 ± 0.88
CRP (mg/ml)	17.15 ± 3.63
White blood cell count, per mm <sup>3</sup>	7.805 ± 0.795
Treatment with β-blockers, n (%)	9 (26)
Corticoid, n (%)	0 (0)

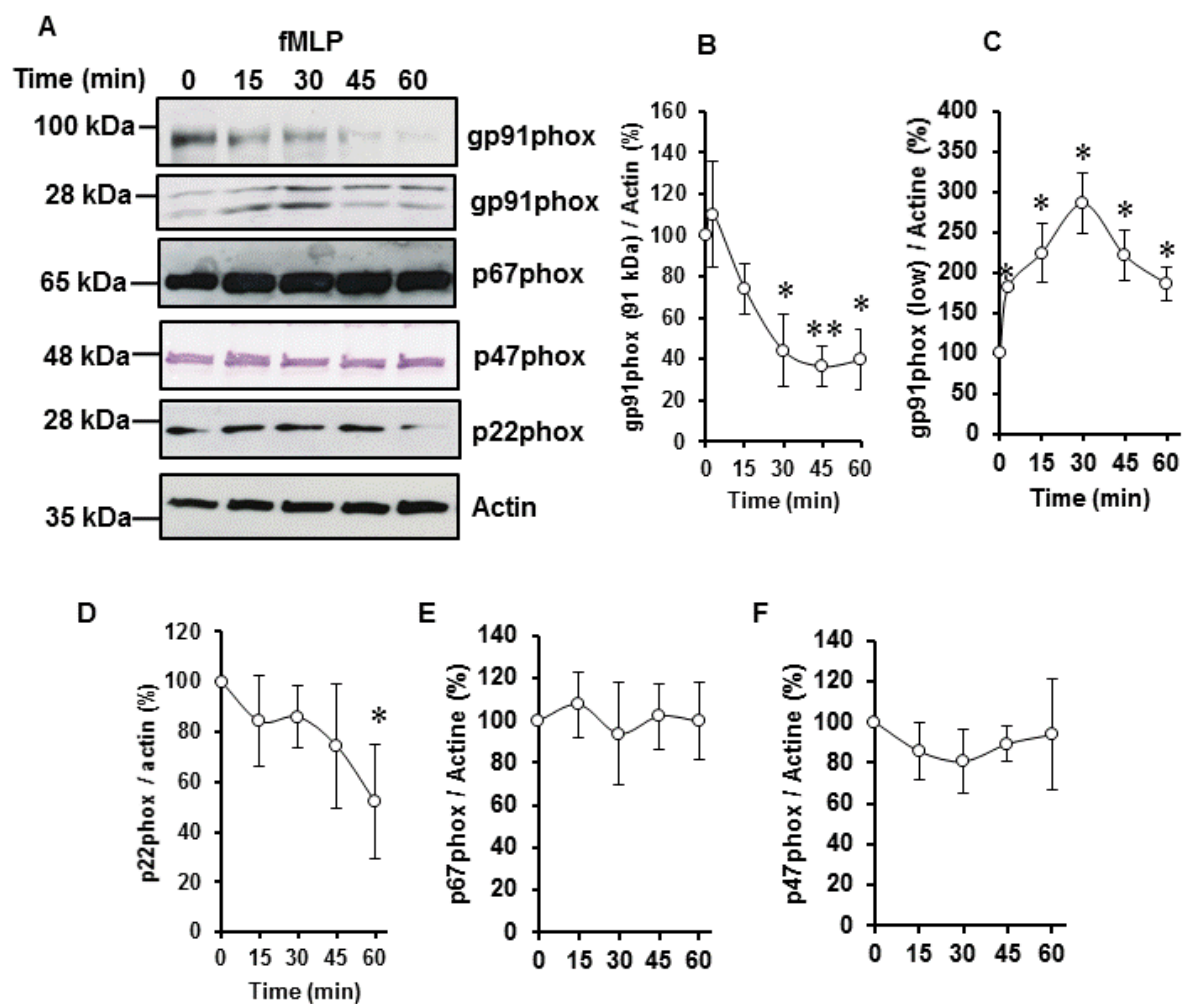
Plus minus values are means ± standard error of the mean

Abbreviation : MELD, Model of End-Stage Liver Disease

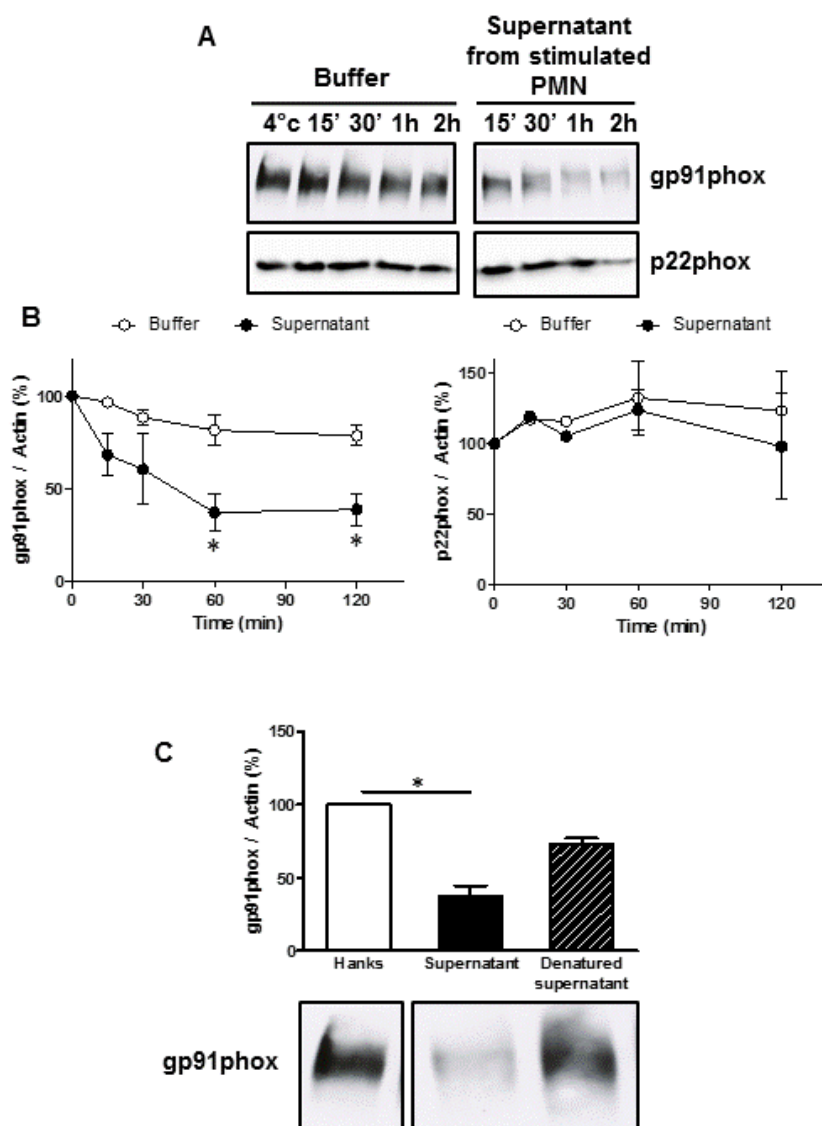
**Figure 1 : Deficient expression of gp91phox, p22phox, p47phox but not p67phox in neutrophils from cirrhotic patients**



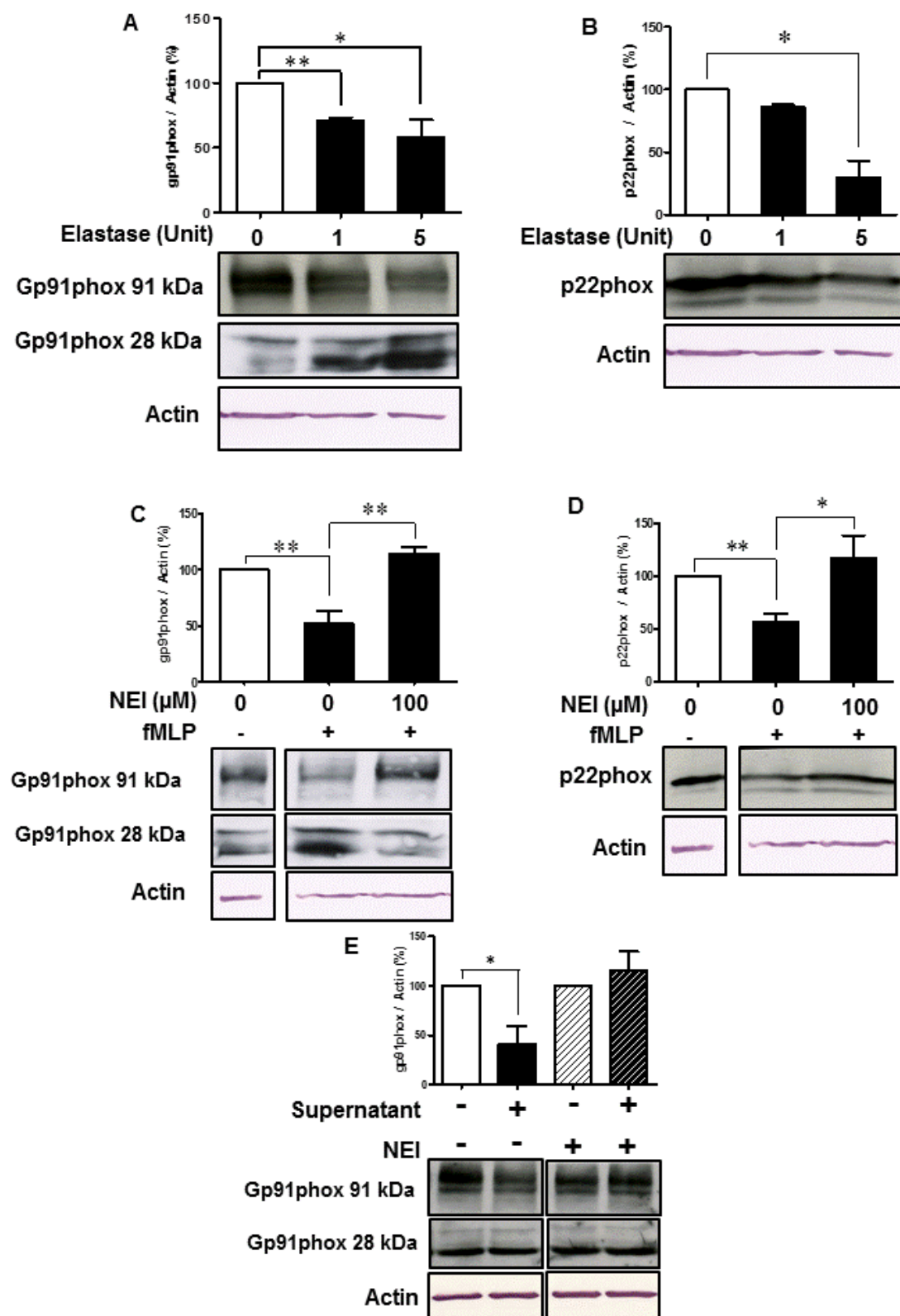
**Figure 2 : A sustained stimulation of neutrophils induced the proteolytic degradation of gp91phox and p22phox but not p67phox and p47phox**



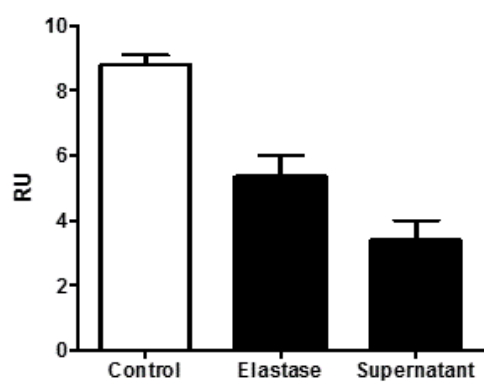
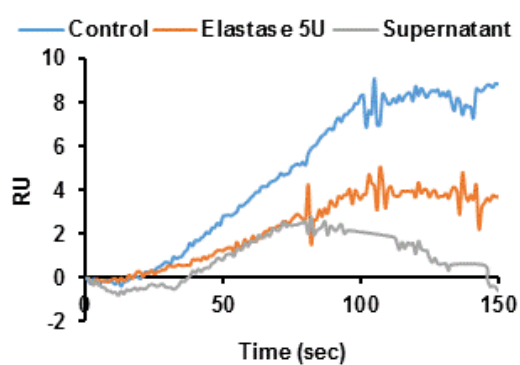
**Figure 3 : Degradation of gp91phox in neutrophil membrane fractions induced by a degranulation supernatant from stimulated neutrophils**



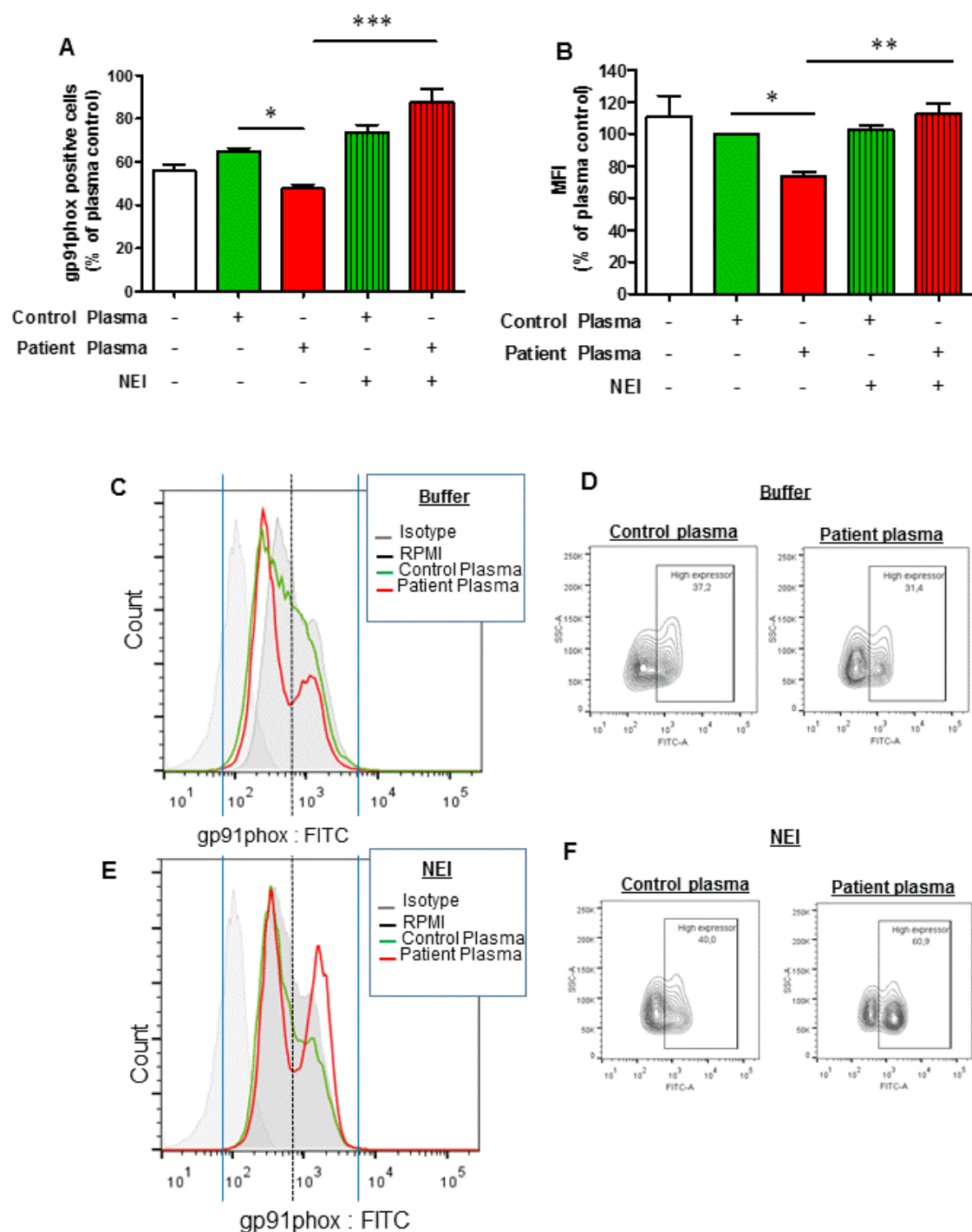
**Figure 4 : Neutrophil elastase induces the degradation of gp91phox and p22phox in healthy neutrophils**



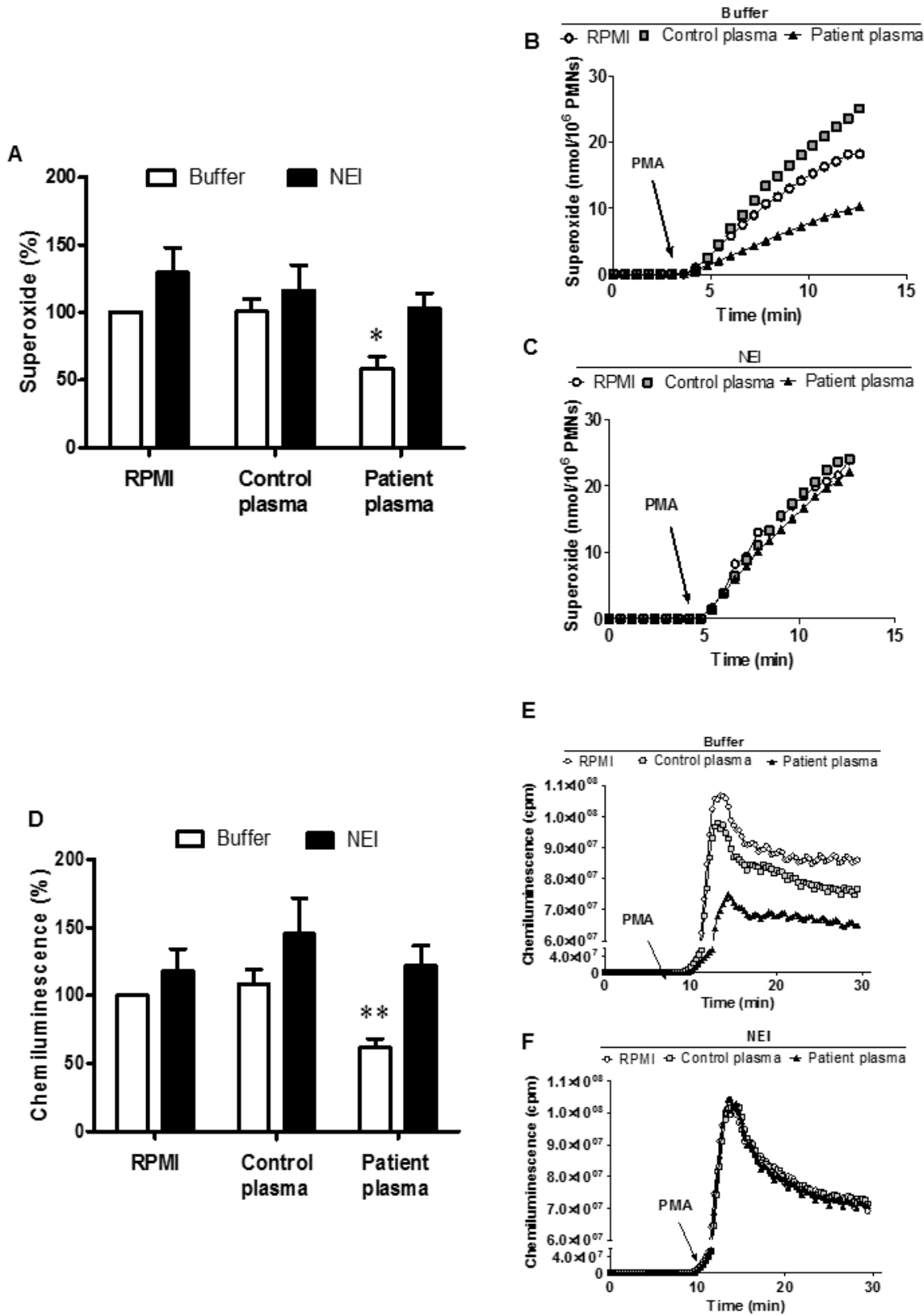
**Figure 5 : Specific binding of neutrophils to the anti-NOX2 antibody and alteration induced by elastase and a degranulation supernatant**



**Figure 6 : Plasma from cirrhotic patients reduces gp91phox expression at the surface of healthy neutrophils in NEI-sensitive manner**

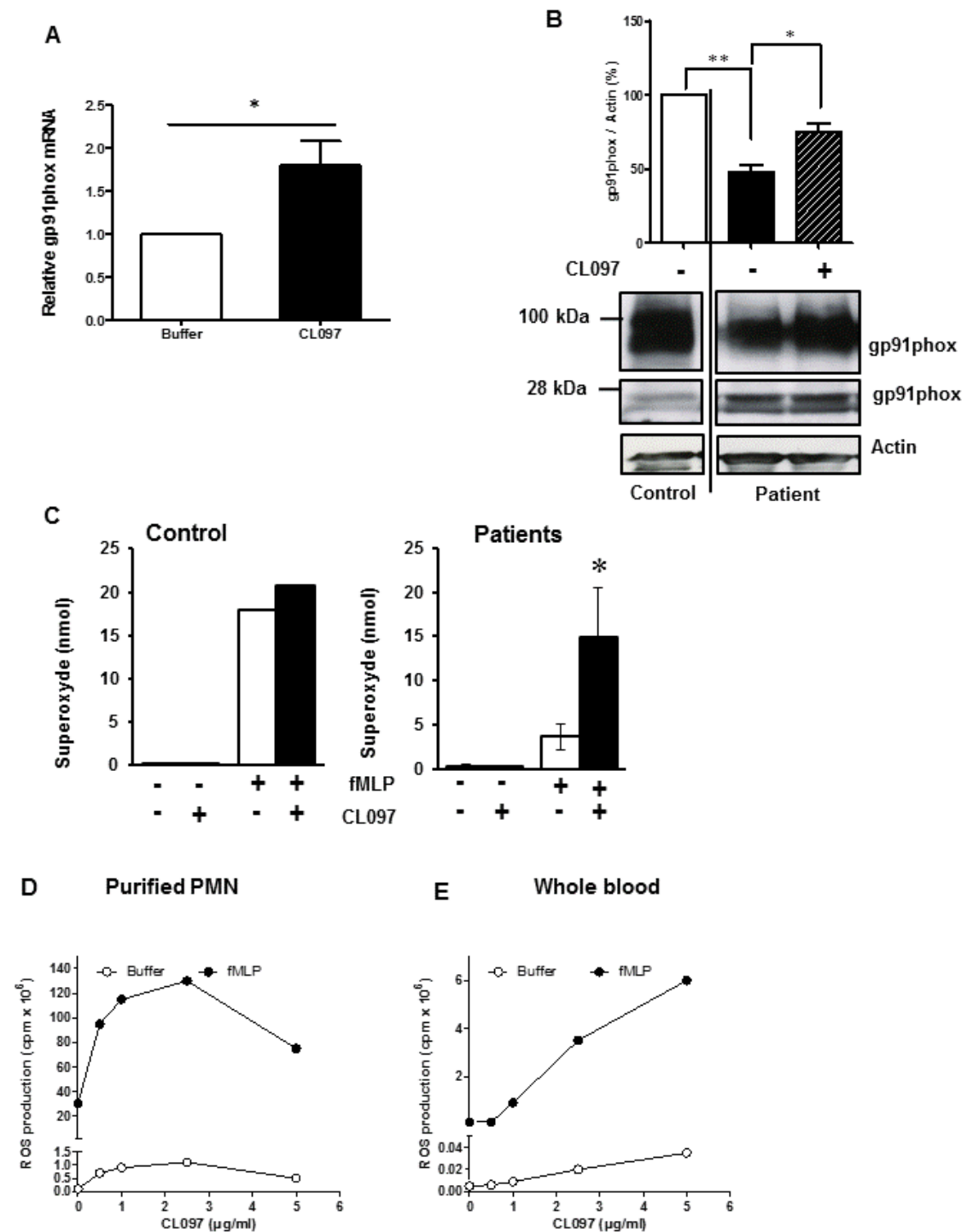


**Figure 7 : Plasma from cirrhotic patients reduces the PMA-induced ROS and superoxide production of healthy neutrophils in NEI-sensitive manner**

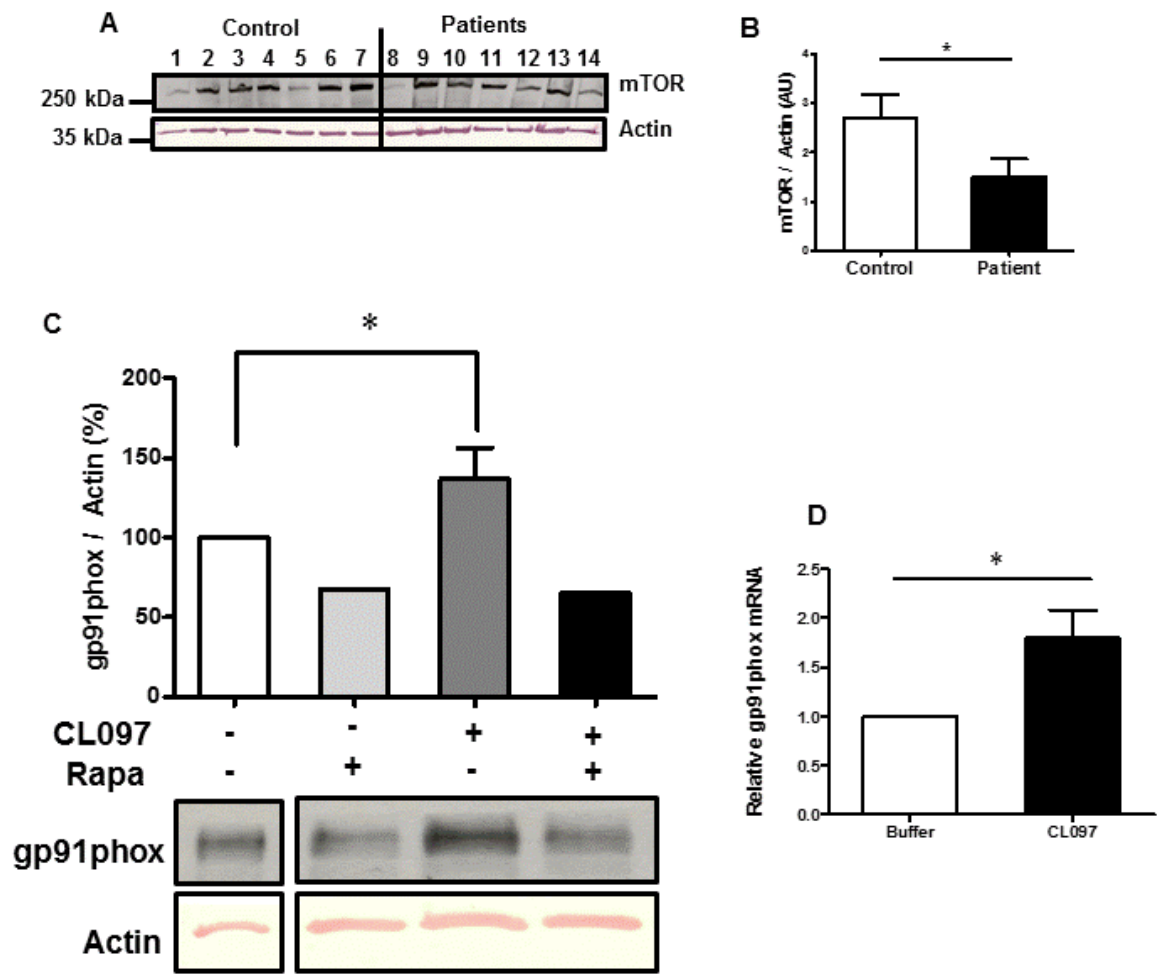




**Figure 8 : The TLR7/8 agonist CL097 restores NOX2 expression in neutrophils from cirrhotic patients and fMLP-induced ROS production in neutrophils and in whole blood.**

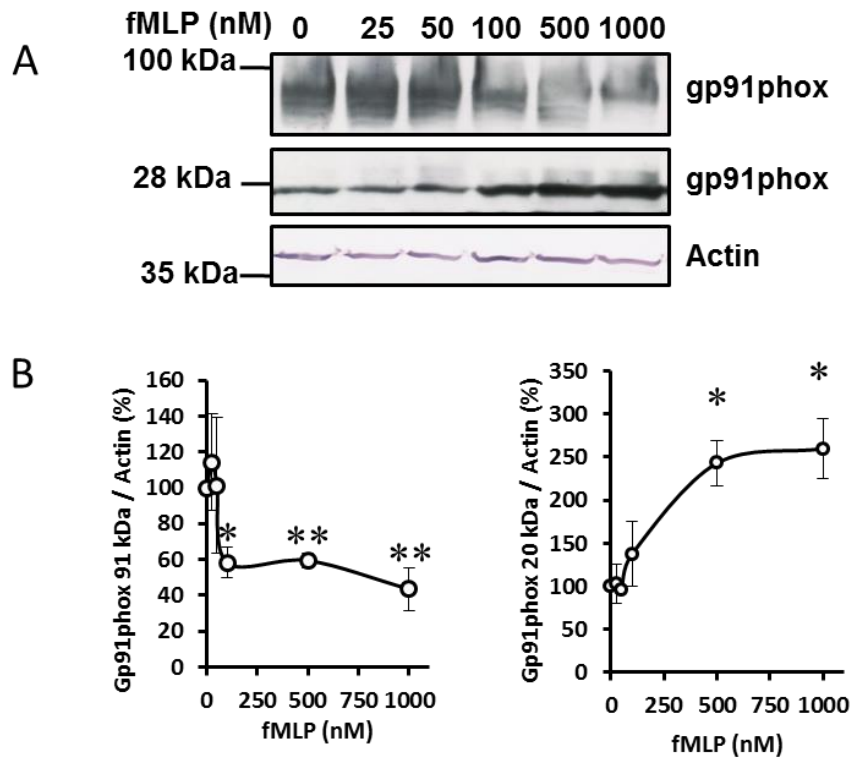


**Figure 9 : The TLR7/8 agonist stimulates gp91phox expression in patients' neutrophils in Rapamycin-dependent manner**



## Supplemental data

Figure S1



**Figure 2. Stimulation of neutrophils induces the proteolytic degradation of gp91phox and p22phox but not p67phox and p47phox. (A)** Western-blot analyses of gp91phox, and actin in neutrophils from healthy volunteers which were stimulated for various fMLP concentration for 45min. Blots are representative of at least 5 experiments and (B) densitometric analyses are cumulative and expressed as percentage of the actin level. A significant difference between mean values  $\pm$ SEM is indicated by \*  $P < 0.05$ .

## Supplemental data

Table S1

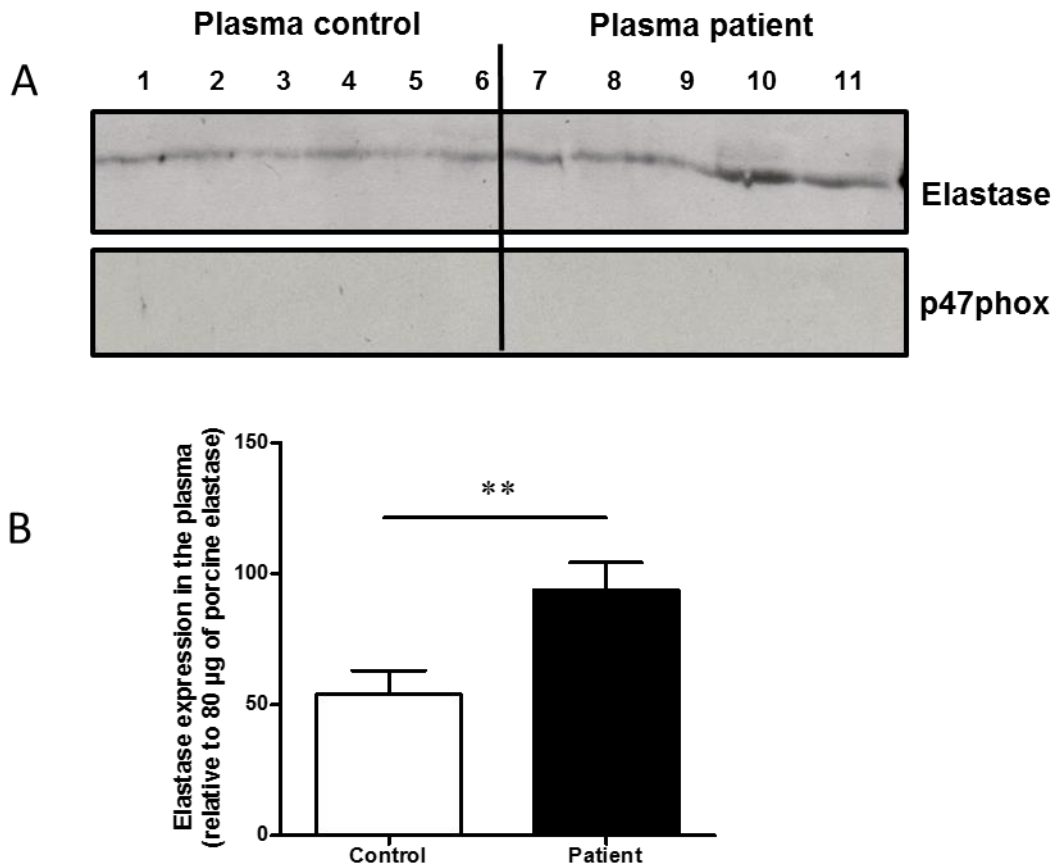
**Table S1 :** Potential proteases that cleave gp91phox

From In silico analysis (MEROPS database)  
Software "Predict Putative Substrates of Proteases":

Protease	Score
Htra2 peptidase	0,38
Protein C	0,32
<b><u>Elastase</u></b>	<b><u>0,31</u></b>
kallikrein-related peptidase 3	0,29
Plasmin	0,20
Chymase	0,16

## Supplemental data

Figure S2



**Figure S2. Plasmas from patients with alcohol liver cirrhosis contain greater amount of elastase than controls. (A)** Western-blot analyses of elastase and p47phox from plasmas from healthy and cirrhotic patients. Aliquots of 5 µl of plasma (equivalent of 10 µg proteins) were denatured in 450 µl of 1X Laemmli buffer. SDS-PAGE were run with 100 µL of sample. **(B)** Densitometric analysis and quantification of elastase, and expression relative to 80 µg of porcine elastase which was western-blotted in the same gels, as reference (not shown). Bars represent the mean ± SEM obtained with 10 patient's plasma. A significant difference between mean groups of values is indicated by \*\* $P < 0.01$ . The absence of p47phox signal indicates that the elastase present in the plasma does not come from intact or necrotic neutrophils.

## 2.3 Résultats annexes des manuscrits 1 et 2

Certains résultats présentés ici n'ont pas fait l'objet d'une publication. D'autres sont préliminaires nécessitant de nouvelles expériences pour confirmation. Cette partie des résultats complémentaires renforçant les modèles abordés dans la publication 1 et le manuscrit 2. Ils traitent de l'axe AKT/mTOR/p38-MAPK/p47<sup>phox</sup> de la dégradation de la gp91<sup>phox</sup> et des preuves supplémentaires de l'implication de l'élastase mais également du protéasome.

### 2.3.1 L'axe AKT / mTOR / p38-MAPK / p47<sup>phox</sup>

Nous avons montré dans la publication 1 que la Rapamycine inhibe la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> des PN stimulés par le fMLP (Figure annexe 1A). Pour déterminer si mTOR est impliquée dans l'initiation de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et/ou sa régulation, nous avons comparé deux paramètres de l'explosion oxydative : la vitesse initiale et la production totale dans les neutrophiles traités par la Rapamycine. Le pré-traitement des PN par la Rapamycine inhibe partiellement la vitesse initiale de la production d'anion superoxyde induite par le fMLP (Fig. annexe 1B) suggérant que ce sont les étapes d'initiation de la production de FRO qui sont régulés par mTORC1. Cependant on observe que l'inhibition de la vitesse initiale n'est que de 25% comparée à l'inhibition de la production totale (Fig annexe 1A) qui est d'environ de 40%, ceci suggère que mTORC1 régule également l'activité de la NOX2. Par ailleurs nous avons tiré profit d'un autre inhibiteur de mTOR (PP242) qui inhibe à la fois mTORC1 et mTORC2 permettant d'évaluer la contribution de mTORC2. Les résultats (Fig annexe 1C) montrent ainsi que le traitement des neutrophiles par PP242 pendant 20 minutes inhibe très fortement (80%) la production d'anion superoxyde induite par fMLP sans affecter la réponse induite par le PMA. Ceci suggère également une contribution majeure de mTORC2 dans la production de FRO induite par fMLP mais pas le PMA ce qui indique par ailleurs que cet inhibiteur n'est pas cytotoxique.

Pour déterminer par quel mécanisme transductionnel mTORC1 régule la production d'anion superoxyde, nous avons comparé l'effet de la Rapamycine sur les phosphorylations des effecteurs transductionnels impliqués dans l'activation de la NADPH oxydase. Les résultats ont montré que les MAPK se situaient en aval de la protéine mTOR suite à la stimulation des cellules par le fMLP et contribuaient à phosphoryler et activer la p47<sup>phox</sup> S345 (Fig 3 Article 1). Une analyse *in silico* (Figure annexe 2 A) a montré que le substrat de mTOR, la kinase S6K1, était en mesure d'activer les modules aboutissant à l'activation de ERK1/2 et p38-MAPK. En outre, mTOR serait également potentiellement capable de phosphoryler directement la p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup>. Cela permet de suggérer de nouvelles pistes pour comprendre la la position

de mTOR dans la cascade de signalisation menant à l'activation de la NADPH oxydase. Nous avons montré que mTOR régule l'activation de ERK1/2 et p38-MAPK (Rolas L et al, 2013) qui par ailleurs phosphorylent p47<sup>phox</sup>. Pour déterminer si mTOR contrôle préférentiellement la phosphorylation de ERK1/2 ou p38-MAPK, la comparaison des IC<sub>50</sub> d'inhibition par la Rapamycine de la p38-MAPK, ERK1/2, p47<sup>phox</sup>, FRO et mTOR, a été effectuée. Les résultats montrent une valeur d'IC<sub>50</sub> proche pour la phosphorylation de mTOR, p38-MAPK, p47<sup>phox</sup> et de la production de FRO (Figure annexe 2 B) alors que l'IC<sub>50</sub> d'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 est deux à trois fois plus fortes. Ceci nous a alors permis de suggérer que mTOR était impliquée dans la phosphorylation de la p47<sup>phox</sup> induite par le fMLP préférentiellement via à la p38-MAPK. Ces résultats mettent en évidence une nouvelle voie de signalisation impliquant séquentiellement mTOR, p38-MAPK, p47<sup>phox</sup> et NOX2.

L'existence de cette nouvelle voie de signalisation impliquant mTOR / p38 et p47<sup>phox</sup> dans les PN stimulés par le fMLP est renforcée par 3 autres nouvelles approches que nous avons utilisé. La première a consisté à immunoprécipiter mTOR dans un lysat de neutrophiles (figure annexe 3 A), ceci montre que mTOR forme un complexe avec AKT, p38-MAPK et p47<sup>phox</sup>. La deuxième approche a consisté à surexprimer AKT1 par transfection dans les lignées HEK 293T exprimant stablement le fPR (Paruch S et al, 2006) (Figure 3 B et C). Les résultats montrent que la surexpression d'AKT stimule les phosphorylations basales de mTOR et de p38-MAPK. A l'inverse, la 3<sup>e</sup> approche, consistant à inhiber la phosphorylation d'AKT par un inhibiteur pharmacologique AKTib 1-2 (Fig 4 D et E), montre que l'inhibition d'AKT a entraîné la diminution des phosphorylations induites par le fMLP de mTOR et p38-MAPK.

Ces résultats suggèrent donc qu'AKT, mTOR, p38-MAPK et p47<sup>phox</sup> forment un nouvel axe de signalisation induit par la stimulation par le fMLP qui est impliqué dans l'activation de la NADPH oxydase.

### **2.3.2 La dégradation de la gp91<sup>phox</sup> induite par le fMLP**

#### **a) Utilisation de 3 anticorps dirigés contre 3 épitopes différents de la gp91<sup>phox</sup>**

Dans le but de déterminer si la diminution de l'expression de la gp91<sup>phox</sup> induite par le fMLP n'était pas due à un artefact lié à l'altération de l'épitope reconnu par l'anticorps souris AC1 (fig. annexe 4A et B). Nous avons utilisé de deux autres anticorps utilisés dans le laboratoire, produits chez le lapin (AC2) et la chèvre (AC3) reconnaissant d'autres épitopes éloignés. Les résultats indiquent que la stimulation des neutrophiles par le fMLP induit une diminution de son expression quelque soit l'anticorps utilisé pour la visualiser (Fig. annexe 4B). Cependant l'anticorps produit dans le lapin (AC2) montre une dégradation beaucoup plus

rapide que celle observée avec les deux autres anticorps cela suggère que l'épitope extracellulaire serait préférentiellement dégradé comparativement aux deux autres épitopes..

Les anticorps produits chez le lapin et la chèvre donnent cependant un signal plus faible que celui réalisé chez la souris ce qui ne permet pas de détecter clairement les produits dégradés (résultats non montrés). Afin de clarifier ce point nous avons utilisé une préparation de membranes enrichies en gp91<sup>phox</sup>, qui a l'avantage de contenir une quantité stable de gp91<sup>phox</sup>, contrairement à la membrane plasmique des neutrophiles entiers. Les résultats montrent que, bien que les 3 anticorps soient susceptibles de reconnaître les produits dégradés de la gp91<sup>phox</sup>, l'anticorps lapin ne reconnaît pas la forme de plus bas poids moléculaire (fig. annexe 4D). Cela suggère que cet épitope ne se trouve pas dans le produit dégradé et qu'une coupure doit donc être effectuée en aval de cet épitope afin de l'exclure. On ne peut cependant pas exclure l'existence d'une dégradation beaucoup plus importante du fragment reconnu par AC2 expliquant pourquoi moins de produits dégradés soient visibles

b) L'élastase libérée par les PN colocalise avec la gp91<sup>phox</sup>

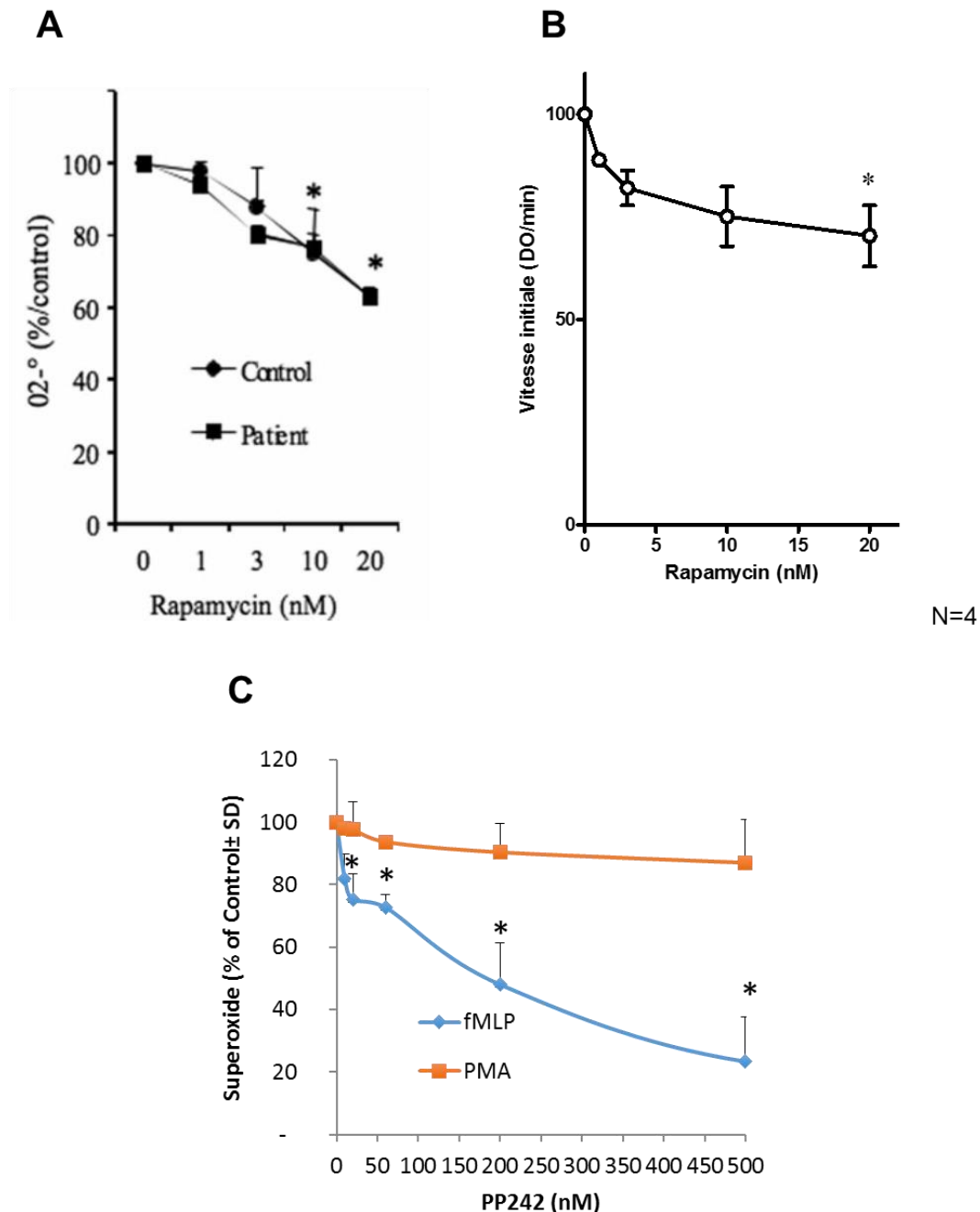
Nos résultats ont montré que l'élastase libérée suite à la stimulation du neutrophile était impliquée dans la dégradation de la gp91<sup>phox</sup>. Afin de déterminer par quel mécanisme cette dégradation pouvait s'effectuer, nous avons examiné si l'élastase et la gp91<sup>phox</sup> colocalisaient suite à la stimulation des neutrophiles par le fMLP. Pour cela nous avons profité de la technologie PLA (Proximity Ligation Assay) qui permet localiser deux protéines avec une résolution de 30 nm. Les neutrophiles ont été ainsi stimulés ou non avec le fMLP, fixés et incubés avec un anticorps dirigé contre la gp91<sup>phox</sup> (7D5) d'une part et dirigé contre l'élastase d'autre part (Fig. Annexe 5). Les résultats montrent un signal fluorescent rouge dans les neutrophiles au repos qui est fortement augmenté après stimulation par le fMLP, suggérant que l'élastase libéré lors de la stimulation aurait la possibilité de se fixer sur la gp91<sup>phox</sup> afin d'induire sa dégradation. Ces résultats obtenus avec deux expériences nécessitent d'être confirmés avec un autre anticorps qui se fixe mieux sur les cellules fixés que le 7D5.

c) Le protéasome est également impliqué dans la dégradation de la gp91<sup>phox</sup>

Le protéasome est l'une des voies classiques par laquelle les protéines sont dégradées après ubiquitination. De récents travaux ont pu montrer l'existence d'une ubiquitinylation de la gp91<sup>phox</sup> suivie par sa dégradation par le protéasome dans le macrophage (Chen F et al, 2012). Ainsi afin de déterminer la contribution du protéasome dans la dégradation de la gp91<sup>phox</sup> induite par le fMLP dans les neutrophiles, nous avons prétraité les neutrophiles avec l'inhibiteur pharmacologique le MG132 avant stimulation des cellules par le fMLP (Fig. annexe 6). Les résultats indiquent que la dégradation du gp91<sup>phox</sup> induite par le fMLP est prévenue par le



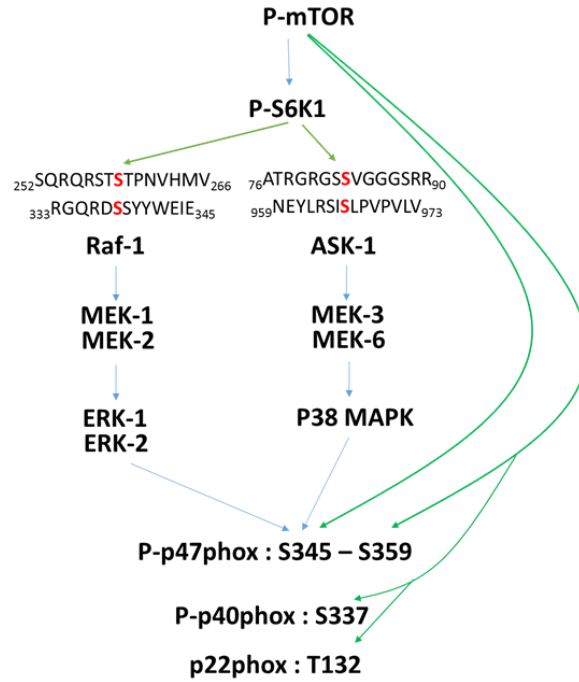
MG132 suggérant un rôle important du protéasome dans la dégradation de la gp91<sup>phox</sup>. Ces résultats obtenus au cours de deux expériences nécessitent d'être confirmé en analysant également les fragments du gp91<sup>phox</sup>.



**Figure annexe 1 :** Effet de la Rapamycine sur la production totale et la vitesse initiale de production d'anion superoxyde de l'explosion oxydative et effet d'un inhibiteur de mTORC1 et mTORC2 PP242

Les neutrophiles (1 million/ml de Hanks) sont pré-traités avec la Rapamycine (1-20 nM) pendant 20 minutes avant stimulation par fMLP (1 $\mu$ M). (A) La production totale d'anion superoxyde des PN contrôle (A) N=12 et sur la vitesse initiale (B) N=4 de la production d'anion superoxyde mesurée par la réduction du cytochrome C ont été calculés et exprimées en pourcentage de la valeur contrôle. Les neutrophiles ont été pré-incubés avec l'inhibiteur de mTORC1/mTORC2 PP242 (C) pendant 20 minutes avant stimulation avec le fMLP (1 $\mu$ M) ou PMA (100 nM). La production totale d'anion superoxyde a été calculée et exprimée en pourcentage de la valeur contrôle (\* =  $p < 0,05$ )

**A**



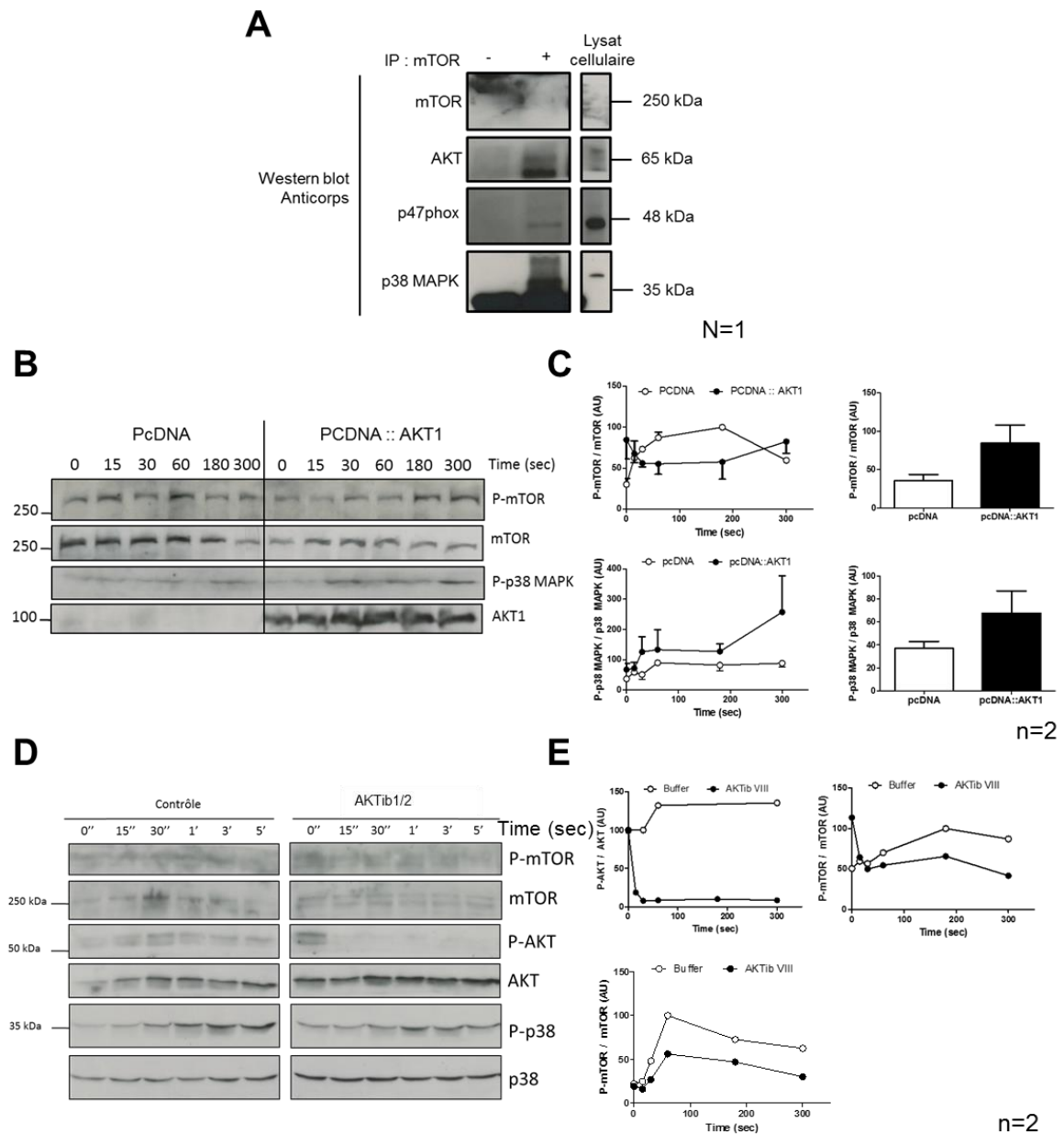
**B**

Comparaison des valeurs d'IC <sub>50</sub> d'inhibition par la Rapamycine				
	FRO	P-p47 <sup>phox</sup>	P-p38	P-ERK1/2
IC <sub>50</sub>	environ 3-5 nM	3 – 5 nM	3 nM	10-15 nM

n=4

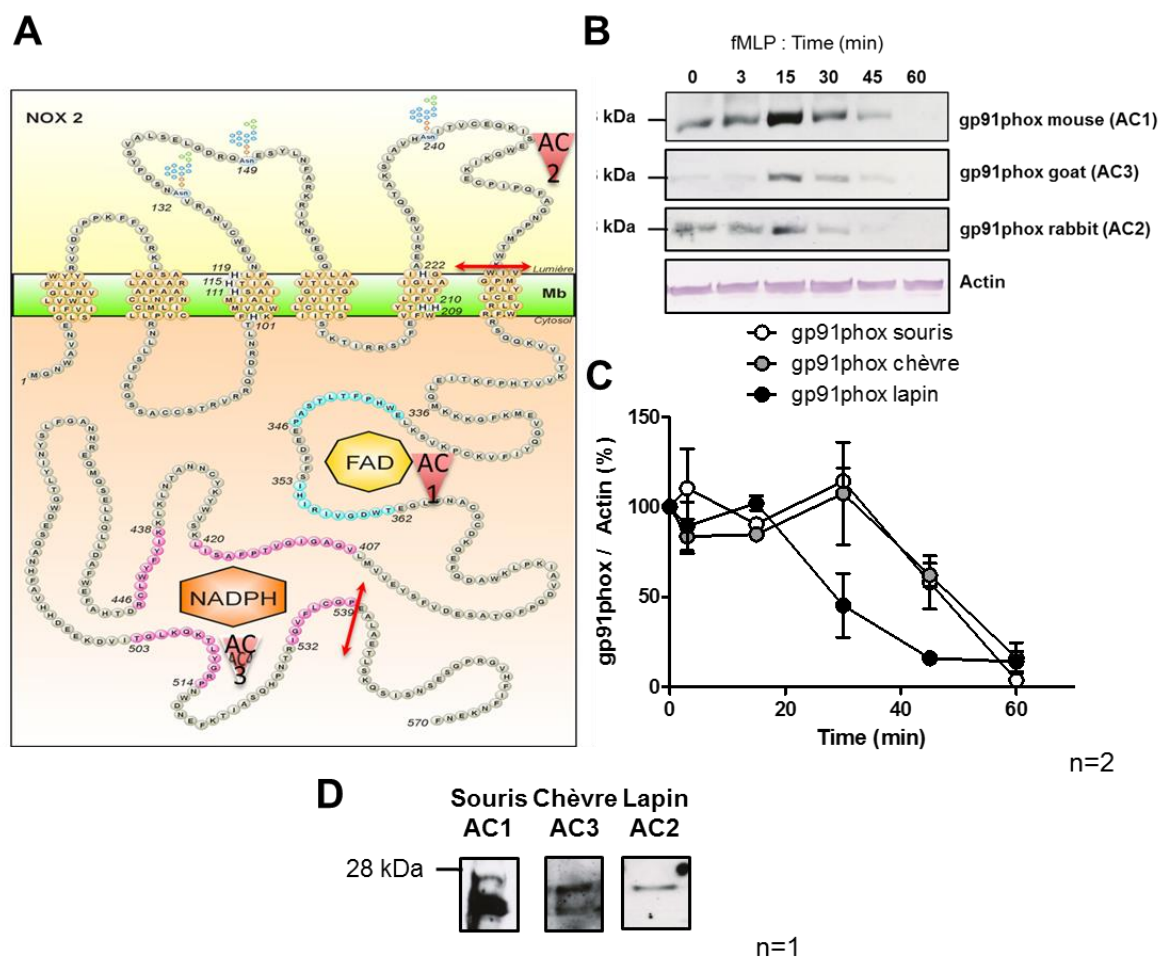
**Figure annexe 2** : Rôle potentiel de mTOR dans la régulation de la phosphorylation des MAPK et de l'explosion oxydative des neutrophiles induits par le fMLP

(A) Probabilité de mTOR et de son substrat S6K1 de réguler le module ERK et p38-MAPK et la phosphorylation dep47phox, p40phox et p22phox analysé par le logiciel GPS 3.0. Seuls les résultats à haut degré de confiance sont représentés. (B) Tableau montrant les valeurs d'IC<sub>50</sub> par la Rapamycine de la production de FRO (Fig2 article 1) induite par le fMLP et des phosphorylations des p47phox, ERK1/2, p38-MAPK (Fig3 article 1).



**Figure annexe 3 : Etude de la voie de signalisation AKT / mTOR / p38 MAPK / p47phox**

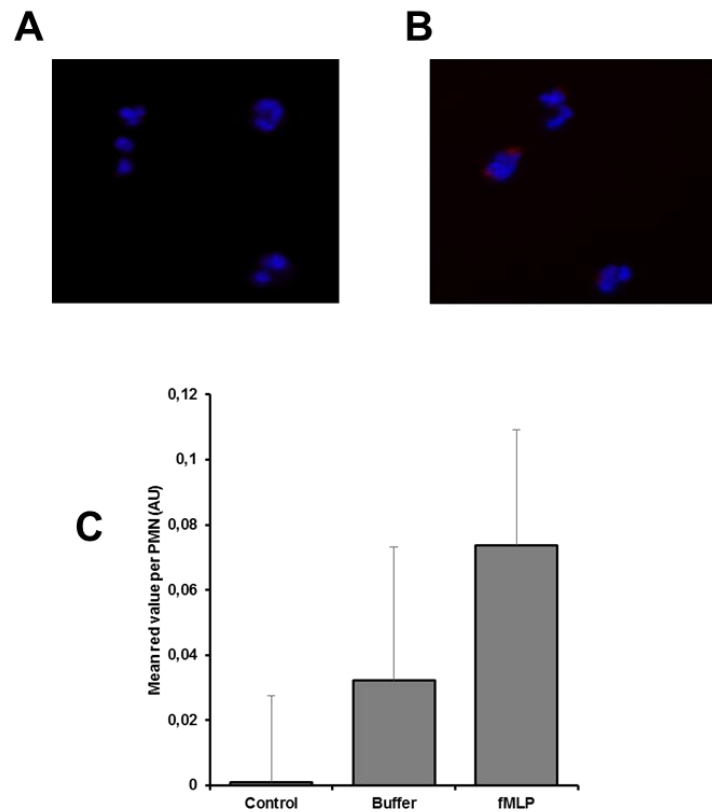
Immunoprécipitation de mTOR (A) : Les neutrophiles sont lysés et le lysat est incubé en présence d'anticorps anti-mTOR et de billes de G-Sépharose. mTOR est immunoprécipité et les protéines associées au complexe d'immunoprécipitation sont visualisées par Western blot. Dans des lignées HEK exprimant stablement le fPR, AKT1 est transfectée. Les cellules sont ensuite lysées et les phosphorylations de mTOR et p38-MAPK sont évaluées par immuno-empreinte (B) et quantifiées (C). Enfin, les neutrophiles (2 millions) sont traités par l'inhibiteur d'AKT (AKTib 3  $\mu$ M) durant 15 minutes puis stimulés par le fMLP. La phosphorylation d'AKT, mTOR et p38-MAPK sont analysées par immuno-empreinte (D) et quantifiées (E).



**Figure annexe 4 :** Dégradation de la gp91phox étudiée à l'aide de 3 anticorps dirigés contre 3 épitopes différents

Les neutrophiles sont stimulés par le fMLP (1  $\mu$ M) selon les temps indiqués puis dénaturés. Trois différents anticorps (A) dirigés contre trois différents épitopes de la gp91phox sont utilisés pour visualiser la gp91phox par immuno-empainte (B) et les résultats ont été quantifiés par Image J et exprimés en pourcentage des contrôles non stimulés (C).

Une préparation de membranes de neutrophiles stimulés par le fMLP (1  $\mu$ M) a été également utilisée pour visualiser les fragments de gp91phox à l'aide des 3 anticorps différents afin de visualiser les fragments de la gp91phox.

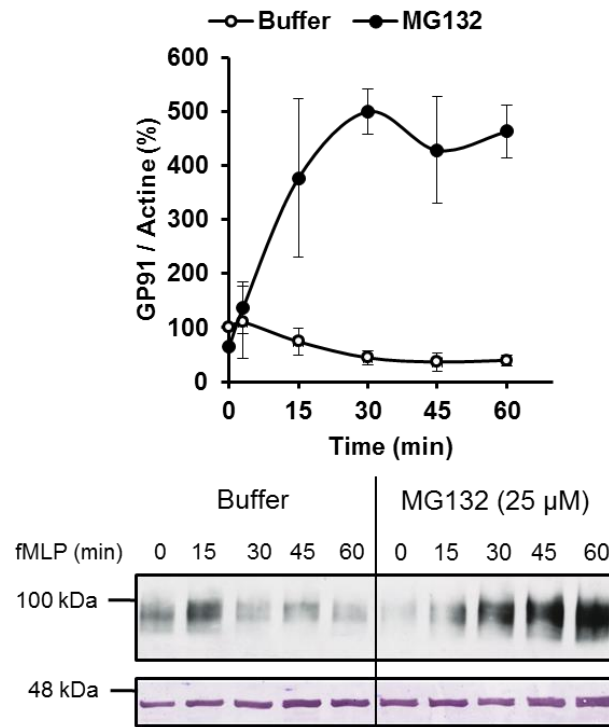


**Figure annexe 5 : L'élastase libérée par les PN colocalise avec la gp91phox membranaire**

Les neutrophiles traités en absence (A) et présence de fMLP 1  $\mu$ M 15 minutes (B) afin d'induire la libération de l'élastase. Les cellules sont ensuite fixées puis collées sur lame de verre avec la polylysine. Les cellules sont d'abord incubées avec anticorps dirigés contre gp91phox (7D5) et l'élastase d'espèce différente puis avec des anticorps secondaires couplés à des amorces de PCR.

Les cellules sont ensuite incubées dans le tampon PCR selon le protocole du fabricant en présence de nucléotides fluorescent. Les noyaux sont enfin colorés en bleu par DAPI.

Le signal de fluorescence rouge reflétant une proximité entre l'élastase et la gp91phox est visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence (A et B). La fluorescence est ensuite quantifiée à l'aide du logiciel Image J (D) et exprimé en unité arbitraire (+/- SD n=2 d'expérience indépendante en duplicate)



**Figure annexe 6 : L'inhibiteur du protéasome (MG132) prévient la dégradation du gp91phox induit par le fMLP**

Des neutrophiles sont traités en absence et présence MG132 (25  $\mu$ M) durant 20 minutes puis stimulés ou non par le fMLP (1 $\mu$ M) selon les temps indiqués. Les PN sont dénaturés et l'expression de la gp91phox est visualisée par immuno-empreinte (B) et quantifiée par Image J (A). Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs contrôles non stimulées (Buffer) +/- SD : n=2

## 2.4 Manuscrit 3 : Défaillance de la libération de MPO des neutrophiles de patients cirrhotiques

### 2.4.1 La défaillance des voies de signalisation en aval d'AKT/MAPK et de la libération de myéloperoxydase par les neutrophiles de patients cirrhotiques

a) Lettre de l'éditeur :

Dear Dr. PERIANIIN,

We regret to inform you that the editorial team handling your manuscript has advised against publication, and in its current form we cannot consider it further. However, we are potentially interested in the subject of your manuscript and we would like to grant you the **possibility to resubmit your manuscript within the next 4 months after major revision**. For guidance when making your revisions, comments from the editorial team are included below.

[...]

Please be aware that there is no commitment to acceptance at this stage.

We thank you for submitting your manuscript to the Journal of Hepatology and for giving us the opportunity to consider your work.

Yours sincerely,

Didier Samuel  
Guest Editor

Rajiv Jalan  
Editor-in-Chief  
Journal of Hepatology

Comments to the Author(s):

Reviewer #1: In this paper, Boussif et al. evaluate the role of AKT/MAPK/MPO in neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis. I have some comments about the work that are listed below:

Major comments:

- In the first part of the results (Fig. 1), I am not quite convinced by the measurement of MPO activity after cell lysis. I understand that there was no difference under basal conditions between control and patients (Fig. 1c) but results with the "fMLP condition" are not provided. This should probably be added. In other words: what is the respective part of degranulation and of a modification in intracellular enzyme activity upon fMLP in controls and patients?



- Beside this, is it possible to strengthen the results by giving an ex vivo test of the efficacy of degranulation (e.g. bacteria lysis)?
- Data on the TLR7/8 are interesting and convincing. However, one would like to know about this pathway in patients with cirrhosis. I would thus suggest adding some results about TLR7/8 expression/ligands in patients as compared to controls.
- Discussion is too long and sounds a bit like a repetition of the results. Please shorten.

Minor comments:

- There are many typing errors that should be corrected.
- Please review table 1 and remove "!"
- Please spell out "RB" and check abbreviations throughout the paper.
- Please add "AKT" in Figure 6 and write a more comprehensive legend.

Reviewer #2: The authors analyzed the MPO-release from neutrophils in alcoholic cirrhosis and highlighted the underlying mechanisms. The paper is very well written and well structured. The authors investigated a very relevant topic, since it is well known that patients with liver cirrhosis are susceptible for infection. This study could show that AKT, ERK and p38-MAPK was deficient in the cells from cirrhotic patients and that the fMLP induced MPO-release is dependent on AKT and p38-MAPK and might be reactivated by TLR7/8. I congratulate the authors on this very important study and have only few remarks:

1. Since the authors studied only alcoholic cirrhosis, could they speculate or deliver any evidence whether this mechanism is relevant also in non-alcoholic cirrhosis?
2. Moreover, does the neutrophil deficiency occur in alcoholic hepatitis? Is the inflammatory or cellular damage a mechanism leading to this dysfunction?
3. Which is the receptor mediating the fMLP-induced signaling? Do the authors have some data or some speculation?
4. Does LPS or Poly-IC have the same effect on the neutrophils? Mediate these pathogens the same intracellular mechanisms?
5. What is the real role of ERK1/2? Is this a parallel „escape mechanism" in this setting?
6. Can the author deliver data or speculate whether also TLR7/8 agonists lead to an improvement in the infections associated function of neutrophils after incubation with other bacterial components? Are there TLR7/8 agonists a good translational approach?

Minor comments:

7. Please show the data in the supplementary figures mentioned in the result section in page 8 and 9
8. Page 10 line 9 please correct „intrinsic"; Page 13 line 8 please correct typo in „... the promising CL097"; Page 13 line 10 please correct typo in „p38-MAPK..."
9. Please check literature since some ref. are underlined?
10. Please explain all abbreviations
11. In table 1 correct „ascites"
12. Please highlight the potential role of TLR7/8 in figure 6 and change PKB into AKT, since these might be misleading for readers not aware of different names of AKT

Reviewer #3: Methods/Models:

- Cohort of patients: needs more detailed definition, e.g. "recent bleed" means exactly exclusion of which time-frame? "current bacterial infection": which diagnostic work-up was performed as standard, e.g. paracentesis, urinary and blood culture? In addition,

medications other than beta-blockers ? history of bacterial infection, SIRS, Sepsis in the past ? exclusion of alcoholic hepatitis ? can the authors exclude alcohol per se to be the main trigger of alterations seen in MPO-release - in other words, to provide data on patients with advanced cirrhosis of different etiology would be greatly helpful.

- MPO activity: spectrophotometric method: can the authors cite a reference the technique is based on /re-established.

- To add attraction to the data and provide functional evidence supporting the hypothesis/conclusion put forward a bacterial killing assay utilizing neutrophils from these patients would vastly help; finally, a mechanism/explanation for the reported impairment in MPO-release (and alteration in AKT/MAP-kinase= downstream events) would greatly upgrade the paper: e.g. is serum of these patients inducing similar changes in neutrophils of healthy volunteers ?

- Why do the authors use different durations of fMLP -stimulation? Fig. 1: 2 min. vs. Fig 2: for 1 minute.

- Can the authors present data on: i) neutrophils from healthy volunteers following the same protocol utilizing CL097 to see who TLR7/8-agonist/stimulation is different in cirrhotics from that in healthy controls. ii) on different cells, e.g. monocytes and the same signaling effectors aiming to test whether the observed changes are neutrophil-specific or more ubiquitous and iii) on intracellular levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HOCl since these are linked to the MPO/-activity and the antimicrobial activity of the individual neutrophil.

#### Results/Interpretation:

Neutrophils from advanced alcoholic cirrhotic patients: i) showed reduced fMLP-induced MPO-release (but no changes in overall MPO-content)

- ii) concomitant deficiency in fMLP-induced phosphorylation of AKT, - p38 and - ERK (but no change in overall protein-expression of AKT, - p38 and -ERK) and iii) pharmacological inhibition of AKT, p38-MAPK but not

-ERK1/2 impacted on fMLP-induced MPO-release; finally iv) a TLR7/8 agonist (CL097) potentiates the fMLP-induced MPO-release in neutrophils of alcoholic cirrhotic patients.

As for iv) the statement that CL097 "restores" fMLP-induced MPO-release is not scientifically proven since not data on the effect of CL097 is shown in healthy controls.

Page 11: spelling error: second paragraph: "From the current degranulation model..."

b) Manuscrit

## **Impaired AKT/MAP-Kinase signaling and myeloperoxidase release in neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis**

Abdelali Boussif<sup>1,2,3,4</sup>, Loïc Rolas<sup>1,2,3</sup>, Emmanuel Weiss<sup>1,2,3,5</sup>, Hamama Bouriche<sup>6</sup>, Richard Moreau<sup>1,2,3,7</sup>, Axel Périanin<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMRS-1149, Faculté de Médecine X. Bichat, 75018 Paris, France

<sup>2</sup>CNRS ERL 8252; Centre de Recherche sur l'Inflammation, 75018, Paris, France

<sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'excellence INFLAMEX, 75018 Paris, France

<sup>4</sup>Université des Batna, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Algérie

<sup>5</sup>Département d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Beaujon, APHP, 92118 Clichy, France

<sup>6</sup>Laboratoire de Biochimie Appliquée, Département de Biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de Vie, Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Algérie

<sup>7</sup>Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Unity, Service d'Hépatologie, Hôpital Beaujon, APHP, 92118 Clichy, France

\*Corresponding author: INSERM 1149, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. Tel: (33)157277473; Fax: (33)157277411; Email: axel.perianin@inserm.fr

*Electronic word count: 5924 words*

*Number of figures and tables: 7 (6 figures + 1 table)*

*Abbreviations* : MPO, myeloperoxidase; fMLP, formyl-Met-Leu-Phe; AKT, MAPK, mitogen-activated protein kinases; ERK1/2, Extracellular Signal-Regulated Kinases1/2; ROS, reactive oxygen species

*Keywords* :

*Conflict of interest*: The authors declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

*Financial support*. This work was supported by INSERM, CNRS and the Labex Inflammex.

*Author's contributions*:

## **Abstract**

**Background & Aims:** Myeloperoxidase exocytosis and production of hydrogen peroxide via the superoxide-generating NADPH oxidase of neutrophils contribute to efficient microbial elimination. Cirrhosis impairs immune functions and increases susceptibility to bacterial infection. We recently showed that neutrophils from patients with decompensated alcoholic cirrhosis has marked alterations in intracellular signaling leading to deficient superoxide production mediated by the bacterial peptide receptor, fPR. Here, we performed ex-vivo studies in neutrophils from these patients to further investigate myeloperoxidase release capacity and signaling events following fPR stimulation by the peptide fMLP.

**Methods:** Myeloperoxidase release from neutrophils was studied by measuring extracellular myeloperoxidase activity. The activation state of signaling effectors was studied by western-blot and their respective effector contribution to myeloperoxidase release was studied using pharmacological antagonists.

**Results:** The fMLP-induced myeloperoxidase release was strongly impaired in neutrophil from cirrhotic patients relative to controls, whereas the intracellular myeloperoxidase content was unaltered. The fMLP-induced phosphorylation of signaling effectors including AKT, ERK1/2 and p38-MAP-Kinases was strongly deficient whereas the total protein expression of these effectors and that of fPR, was unaltered. Pharmacological inhibition of signaling effectors in neutrophils from healthy subjects revealed that only AKT and p38-MAP-Kinase contributed significantly to fMLP-induced myeloperoxidase release. Interestingly, a TLR7/8 agonist (CL097) that reactivated p38-MAPK restored myeloperoxidase release from patients' neutrophils.

**Conclusions:** We provide first evidence that neutrophils from patients with decompensated alcoholic cirrhosis exhibit deficient AKT/MAP-Kinase signaling and a reversible impaired myeloperoxidase release. Therefore, the defective myeloperoxidase release and previously described deficient superoxide production may increase cirrhotic patients' susceptibility to bacterial infections.

## **Introduction**

Neutrophils play a key role in the elimination of invading microorganisms (1-Babior, 2004). This innate defense function requires a fine coordination of two major neutrophil activities, the release of myeloperoxidase (MPO) from azurophilic granules (exocytosis) and production of reactive oxygen species (ROS) by the plasma membrane superoxide-generating NADPH oxidase (NOX2), a phenomenon termed respiratory burst (RB). Released MPO utilizes hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) derived from superoxide dismutation, and chloride to form hypochlorite and chloramine, which are toxic agents for bacteria (2-Klebanoff, 2005, 3-Nauseef, 2014). The importance of MPO *in vivo* is further illustrated in MPO-knockout mice by an increase infection by *Klebsiella* and *Candida*, increased mortality (4-Aratani, 2004) and prolonged inflammation (5-El-Kebir, 2008). Both MPO release and ROS production are triggered by various pro-

inflammatory mediators among which bacterial formylated peptides which are also chemotactic and thus alert neutrophils in case of infection by stimulating their plasma membrane sensor, fPR, a G-protein coupled receptor. Neutrophil antibacterial activities are tightly regulated by various signaling events triggered via fPR involving phospholipases, small G-proteins, lipid kinases, protein kinases such as protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinases (MAPK) and mammalian target of rapamycin (6-Costa 2010, 7-Futosi, 2013; 8-Rolas, 2013). Alteration of signaling effectors under pathological situations or by drugs result in neutrophil dysfunctions which may be detrimental to host-defense mechanisms (9-Dinauer; 2014, 10-Kruger, 2015, 11-Doward, 2015).

Alcoholic cirrhosis is a consequence of excessive alcohol consumption and represents a major cause of mortality

worldwide with an estimated 3.8% of all global death (14-Rehm J, 2009). This pathology combines different states of the liver disease including steatosis, inflammation, necrosis and fibrosis (13-Naveau, 2006; 14- Ceni, 2014). Cirrhosis is associated with immune dysfunctions and the inability of host-defense systems to protect against infections (15-Albillos A, 2014). Neutrophils are involved in the pathogenesis of cirrhosis through their contribution to liver injury in animal models (reviewed in 16-Ramiah SK, 2007) as well in patients with alcoholic steatohepatitis (17-Lucey RM, 2009). Direct evidence for a role of neutrophils inducing liver injury is provided by the observation of an intracellular oxidant stress in hepatocytes during neutrophil attack (18-Jaesche, 1999). However, the view that neutrophils are deleterious is not universally recognized in alcohol hepatitis. Indeed, Altamirano et al showed that the higher neutrophil liver infiltration the better the prognosis (19-Altamirano 2014). Potential neutrophil beneficial responses include their production of hepatocyte growth factor (20-Taieb, 2002), collagen degradation (21-Harti, 2010) and granulopoiesis following G-CSF treatment (22-Kyle , 2009). Moreover, there is at least one study showing that G-CSF therapy is beneficial in patients with severe alcoholic hepatitis (23-Singh, 2014). Finally, G-CSF therapy was found to improve survival in patients with acute-on-chronic liver failure, the most severe complication of cirrhosis (24-Garg, 2012).

A common complication of cirrhosis is the development of sepsis which is a major cause of death (25-21-Arvaniti V, 2010, 12-14-Rehm J, 2009). Although medical treatments exist to improve survival, about 35% percent of patients die within six months (26-22-Moreau, 2014). Of the numerous circulating defenses available, neutrophil activities such as ROS production, microbicidal activity and phagocytosis are impaired in cirrhotic patients [27, Féliu, 1977, 28-27-Rajkowitz,1987; [29-28-Lebrun, 1992 #1310] (30-29-Garfia 2004, 31-30-Panasiuk 2005; 32-Mokerjee 2007; [33] Stadlbauer V -34-31-Ward, 2010, 35-32-Markwick, 2015)]. An impaired RB of

neutrophils was also observed in liver transplant recipients suffering from post-hepatic cirrhosis [36-35- Juttner, 2009]. However, the impact of cirrhosis and alcohol cirrhosis on receptor-mediated intracellular signaling events underlying neutrophil antibacterial activities remain largely unknown. In a recent study with neutrophils from patients with decompensated alcohol cirrhosis, we observed a dramatic impairment of signaling and ROS production induced by the bacterial-derived peptide fMet-Leu-Phe (fMLP), which was aggravated by rapamycin (8- 12-Rolas, 2013). This neutrophil dysfunction was associated with a defective MAPK-dependent phosphorylation of p47<sup>phox</sup>, a major component of the superoxide-generating NADPH oxidase complex. Whether the defective intracellular signaling alters other neutrophil defense functions is unknown.

In this study, we took advantage of these neutrophils from patients with advanced alcoholic cirrhosis to investigate possible alterations of MPO release induced by the bacterial peptide fMLP. The state of activation of major signaling effectors such as AKT, p38-MAP-kinases and p44/42 MAP-kinases (ERK1/2), and expression of effectors were also determined, and their respective contribution in MPO release was studied in healthy neutrophils using selective antagonists. The data provide evidence of severe impairment of the three major signaling pathways in patients' neutrophils, with two of them contributing to a deficient MPO exocytosis. Results further suggest that the deficient MPO release can be corrected.

## Patients and methods

### Reagents

Antibodies used i.e. phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204), phospho-p38MAP-Kinases (Thr180/Tyr182), phospho-AKT(S473) were from Cell Signaling (Leiden, The Netherlands), anti-ERK1 and peroxidase-conjugated antibodies were from Santa Cruz (Heidelberg, German), anti actin was from Millipore (Saint Quentin-en-Yvelines). Myeloperoxidase substrate ortho-dianisidine dichloride was from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Myeloperoxidase fluorescent substrate was

from Biovision. The protease inhibitor cocktail was from Roche and the Restore western-blot stripping buffer was from Pierce. SDS-PAGE. Western-blotting reagents were from BioRad (Marnes la Coquette, France) and Iblot nitrocellulose stacks from Life Technologies (Saint Aubin, France). CL097 was from InvivoGen (San Diego, USA). All other reagents were from Sigma.

#### Patients

Patients' blood samples were obtained as previously described (12-Rolas, 2013). Briefly, Patients were hospitalized in the Liver Unit of Beaujon Hospital (Clichy, France). Inclusion criteria were age over 18 years, biopsy-proven cirrhosis, and Child-Pugh class B or C cirrhosis. Patients had a history of excessive alcohol ingestion (50 g/day), but no other causes of liver disease. Viral serologies for hepatitis B virus and hepatitis C virus were negative. Alcohol consumption was stopped for at least 3 days. Clinical characteristics of patients are shown in Table 1. Exclusion criteria were evidence of recent gastrointestinal bleeding, current bacterial infections, treatment with corticosteroids, pentoxifylline or other immunosuppressive drugs in the past 30 days, and presence of hepatocellular carcinoma, other cancer, or human immunodeficiency virus infection. Healthy subjects (controls) were hospital employee volunteers or obtained from the blood bank (EFS, Paris, France). This study was approved by our institutional review board, and written informed consent was obtained from all patients.

#### Purification of neutrophils

Peripheral blood from healthy volunteers or cirrhotic patients was collected in EDTA-containing tubes. Neutrophils were purified by a first step sedimentation on 1% Dextran in saline followed by centrifugation on a cushion of Ficoll-Hypaque (400g-30 min). Contaminating red cells were lysed under hypotonic conditions (30sec) (12) and the purified neutrophils (95-98%) were washed twice and suspended in Hank's balanced salt solution (pH 7.4) containing magnesium and 1.2 mM calcium.

#### Degranulation assay

Neutrophils ( $2 \times 10^6/400 \mu\text{l}$  HBSS) were preincubated at  $37^\circ\text{C}$  in the absence or presence of cytochalasin B (CB) for 5 min prior stimulation with fMLP ( $1 \mu\text{M}$ ) for 2min. Degranulation was stopped by incubating the Eppendorf tube bottom in ice-cold methanol ( $-80^\circ\text{C}$ ) for 5 sec. Cells were centrifuged at  $4^\circ\text{C}$  and supernatants were used immediately for enzymes activities assays. Cells pellets were homogenized in lysis buffer for western-blot analysis. In some experiments, total MPO activity was quantified in cell homogenates prepared by sonication of neutrophils ( $10^7$  cell/ml) in PBS containing a cocktail of antiproteases, and centrifugation ( $400 \times 10 \text{ min}$ ).

MPO activity was measured by spectrophotometric method using its specific colorimetric substrate, O-dianisidine. Degranulation supernatants ( $50 \mu\text{l}$ ) were incubated in 96-well transparent microplate, with  $200 \mu\text{M}$  of O-dianisidine and  $4.4 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in a final volume of  $250 \mu\text{l}$  HBSS. MPO activity was determined as change of optical density (OD) at  $460 \text{ nm}$  measured for 3 min in a microplate-reader spectrophotometer (THERMOmax<sup>TM</sup>, Molecular device California). Results are expressed as  $\text{DO}/10^6$  cells or as percentage of control values. In some experiments, MPO activity was measured using the fluorescent MPO peroxidation substrate (Biovision) according to manufacturer protocol.

#### Western-blot analysis

Cells were lysed in  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl, pH 6.8 containing  $2.5 \text{ mM}$  orthovanadate,  $2.5 \text{ mM}$  EDTA,  $5 \text{ M}$  urea,  $1 \text{ mM}$  DTT, a cocktail of antiproteases (Complete<sup>TM</sup>, Roche) and 1X Laemmli sample buffer, and subjected to western blotting experiment using standard protocols (12). Horse peroxidase-conjugated secondary antibody were used and visualized with enhanced chemiluminescence (ECL). Protein phosphorylation was quantified with the NIH Image J 1.62 software and expressed as a percentage of actin expression.

*Statistical analysis.* Unless otherwise stated, data represent means  $\pm$  SEM. Differences between means were identified

using the Student's paired t-test or Mann-Whitney U test, with a threshold of  $P < 0.05$ . Statistically significant differences are designated by \*.

## Results

### *Severe impairment of fMLP-induced MPO release and signaling in neutrophils from patients with advanced alcoholic cirrhosis.*

Stimulation of healthy neutrophils under standard optimal conditions by fMLP (1  $\mu$ M) induced a weak release of MPO of approximately 10% of the total MPO content (Fig. 1A and C). Under these stimulation conditions, neutrophils from cirrhotic patients exhibited an impaired MPO release compared to that of healthy neutrophils. Optimizing the degranulation process by pretreating cells with the microtubule-disrupting agent cytochalasin B, enhanced fMLP-induced MPO release (Fig. 1B). The cytochalasin B potentiating effect was of the same order in both healthy and patient neutrophils suggesting that the cytoskeleton mobilization was not altered. In neutrophils from cirrhotic patients, the cytochalasin B-primed the fMLP-induced MPO release was impaired relative to controls, while basal degranulation was not altered (Fig. 1A). To examine whether this deficient MPO release was related to intracellular stock of MPO, intact cells were lysed and MPO was quantified by measuring both MPO activity (Fig. 1C) and protein expression by western-blot analyses (Fig. 1D-E). Both approaches showed no significant alteration of the MPO intracellular pool, which suggests that the deficient MPO release may result from altered fPR1-mediated signaling. To further explore this hypothesis, neutrophils were stimulated under optimal conditions with fMLP (1  $\mu$ M) for 1 min and the activated phosphorylated form of three major signaling effectors was analyzed by western-blot (37 Paruch, 2006, 38- Patel 2010, 8- Rolas, 2013). As shown in Fig. 2A, stimulation of healthy neutrophils by fMLP induced a rapid phosphorylation of AKT, p38-MAPK and p44/42 MAPK (ERK1/2). By contrast, these phosphorylations were dramatically impaired in neutrophils from cirrhotic patients (Fig. 2B, C and D), whereas

no alteration was observed in the expression of the three signaling effectors (Fig. 3A and B) and fPR (Fig. 3C and D).

### *A major role of AKT, p38-MAPK but not ERK1/2 in fMLP-induced neutrophil MPO release.*

The signaling mechanisms by which bacterial peptides induce MPO release from neutrophils remains largely unknown. To further examine the respective contribution of AKT, P38-MAPK and ERK1/2 to MPO release, a pharmacological approach was used in healthy neutrophils to prevent the effector activation by selective antagonists. In neutrophils pretreated with 1-10  $\mu$ M AKTib1/2 Blocking AKT activation with AKTib1/2 (8-Payel) as shown in the supplementary Fig. 1A and B, inhibited fMLP-induced MPO release by approximately 40-50%, without altering basal MPO release (Fig. 4A) or the catalytic MPO activity measured in neutrophil homogenates (data not shown). The almost complete inhibition of fMLP-induced p38-MAPK activation was obtained by pretreating cells with SB190202 up to 10  $\mu$ M (Supplementary Fig. 2A and B). This treatment also reduced fMLP-induced MPO release by approximately 50% without altering basal MPO release (Fig. 4B) or MPO activity in neutrophil homogenates (data not shown). Since both antagonists reduced MPO release about 50%, we wondered whether AKT up-regulates p38-MAPK activation. Interestingly, a similar inhibition of p38-MAPK activation was observed neutrophils pretreated by AKTib1/2 (Supplementary Fig. 2C and D), which suggests that p38-MAPK is activated downstream AKT. To examine the contribution of ERK1/2 to MPO release, cells were pretreated with its selective antagonist U0126 (1-10  $\mu$ M) (37- Paruch, 2007). This treatment led to complete inhibition of the fMLP-induced ERK1/2 phosphorylation (Supplementary Fig. 3A and B). Surprisingly, the fMLP-induced MPO release was also blocked (data not shown). This complete inhibition was actually due to a direct interference effect with MPO activity in neutrophil homogenates and degranulation supernatants (data not shown). To further examine a role of ERK1/2 in exocytosis of

primary granules, the effect of U0126 was examined on the release of elastase, another marker of primary granules. Blocking ERK1/2 activation did not alter fMLP-induced elastase release while superoxide production was impaired (Fig. 4C). These results strongly suggest that ERK1/2 was not involved in MPO degranulation, in agreement with other works (39-38- Moscai, 2000).

#### *A TLR7/8 agonist restored MPO release from neutrophils of cirrhotic patients.*

The above data strongly suggest that p38-MAPK but not ERK2 played a significant contribution to MPO release from neutrophils (Fig. 4B-C) and that its deficient activation of p38-MAPK observed with patients' neutrophils (Fig. 2A and C) may contribute to the defective MPO release (Fig. 1A-B). It has been shown that the p38-MAPK signaling can be activated upon stimulation of intracellular Toll-Like receptors 7/8 by the cell permeable agonist CL097 leading to enhanced neutrophil stimulation, as detected by production of superoxide (40 Makni, 2012). As an attempt to determine whether MPO release from patients' neutrophils can be improved, cells were treated ex-vivo in the absence or presence of CL097 before stimulation with fMLP for various times. This treatment increased basal phosphorylation of p38-MAPK and maintained the level of phosphorylation induced by fMLP, whereas in the absence of CL097, p38-MAPK was transiently activated with a peak of phosphorylation observed at 1 min (Fig. 5A and B). Interestingly, the deficient fMLP-induced MPO release from neutrophils from cirrhotic patients was also potentiated (Fig. 5C) reaching values closed to those obtained with normal neutrophils (Fig. 1B).

#### **Discussion**

Decompensated alcoholic cirrhosis is a potentially fatal liver disease with about 26% of patients having bacterial infection on hospital admission (41-39-Lucey 2009). Approximately one third of patients die within the first month due to the development of multiorgan failure (42-40- Moreau 2013). Neutrophils which represent the first cellular line of defense against bacteria become

altered during the disease progression and may contribute to susceptibility to severe sepsis and septic shock. Various defense activities of neutrophils are impaired in patients with alcoholic cirrhosis including phagocytosis, ROS production, chemotaxis [27-34]. Deficiencies were more or less pronounced as a function of the degree of severity of the disease (28-Rajkovic A, 1986, 29-Lebrun, 30-Garfia 2004, 35-Markwick, 2015). The biochemical mechanisms underlying these neutrophil dysfunctions remain unknown. In most studies, neutrophil dysfunctions persisted after cell washing reflecting intrinsic cellular alterations (27-30) while in some studies dysfunctions were reversible after removal of endotoxins from patients' plasma (32-Mokerjee 2007). Of particular interest is the pathological dual effect of high concentrations of ammonia in patients' plasmas, since ammonia was found to decrease neutrophil phagocytic capacity but stimulate spontaneous production ROS (44-Shawcross 2008). Biochemical alterations induced by ROS are nonspecific and may secondarily impacted intracellular processes underlying various defense activities of neutrophils.

This ex-vivo study provides first evidence that decompensated alcoholic cirrhosis strongly inhibits the activation three major signaling effectors induced by bacterial peptide fMLP in human neutrophils (summarized in Fig. 6). However, the activation of AKT and p38-MAPK was more sensitive to inhibition by alcohol cirrhosis than ERK1/2 (Fig. 2A and 6). These inhibitory effects were not due to impairment of the expression of the three signaling effectors (Fig. 3A-B) or the fMLP receptor, fPR (Fig 3C-D), which suggests that the molecular origins of such signaling defects may take place at early signaling events upstream of the three effectors (Fig. 6). One potential candidate for these neutrophil dysfunctions is the inositol-specific phospholipase C (InsPLC) which was found to be also impaired in fMLP-stimulated neutrophils of cirrhotic patients (30-Garfia 2004). InsPLC generates diacylglycerol and inositol trisphosphate, the later increasing intracellular calcium concentration (45-Berridge, 1984). DAG and



calcium activates several PKC that activate AKT and MAP kinases signaling pathways (46-Tang, 2011, 47-Chiarelli). In neutrophils, PLC (PLC $\beta$ 2) is directly activated by the  $\beta\gamma$  subunits of a trimeric G protein (Gi) (48-Lee SB, 1993) coupled to fPR, which suggests that the biochemical alterations mediated by alcohol cirrhosis may affect early signaling events proximal to plasma membrane receptors. Consistent with this hypothesis, Garfia et al showed that neutrophils from alcohol cirrhotic patients exhibited an impaired ROS production induced by direct activators of trimeric G proteins such as NaF or ALF4- (30-Garfia, 2004), which suggests possible alterations of the pertussis-toxin sensitive G-protein (Gi) coupled to fPR. Other early signaling events, i.e. the PI3-kinase/AKT signaling pathway was also impacted in monocytes from cirrhotic patients (49-Tazi, 2006).

The release of MPO from stimulated neutrophils is regulated by complex mechanisms involving several signaling steps (50-Lacy, 2006). Cytoplasmic azurophilic granules are transported to the target membranes via a process involving cytoskeletal mobilization, microtubule assembly and motor proteins. Then, they come into contact of membranes by tethering and docking factors. Exocytosis involves mutual recognition of granular vesicles by the target membranes. This is achieved by specific interactions of soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptors (SNAREs) located on granules/vesicles (v-SNAREs) with the plasma membrane t-SNAREs, which guides the docking of the granule membrane and its fusion with the target membrane. Several signaling effectors have been involved in exocytosis of azurophilic granules from stimulated neutrophils, including Hsk tyrosine kinase, the small G-protein RAC2, calcium and PKC (50-Lacy, 2006; 51-Bertram A, 2011), although their molecular mode of action remains not known. However, in other cell types, activation of PKC lead to phosphorylation of proteins of the motor system such as SNAP-25, Munc-18 and synaptotagmins that can act as PKC substrates. It is unknown whether alcoholic cirrhosis alter the activation of these signaling effectors, vesical mobilization by cytoskeleton

and/or the granule fusion process.

In this study, two of the three signaling effectors analyzed, AKT and p38-MAPK, turn out to be novel majors regulators of MPO release. This is supported by inhibitory effects of their antagonists in healthy neutrophils (Fig. 4A and B) and by their deficient activation in neutrophils from cirrhotic patients (Fig. 2). Moreover, p38-MAPK appears to be partially activated downstream AKT (Supplementary Fig. 2C-D), which may explain in part their strong inhibition in patients' neutrophils (Fig. 2). The involvement of p38-MAPK in exocytosis of primary granules is consistent with other works done with neutrophils from Src knock-out mice, which localise p38-MAPK downstream the Src tyrosine kinase (39-Moscai et al 2000). However, the mechanism by which AKT regulates p38-MAPK activity in neutrophils remains not known. Other proteins kinases have been involved in the release of MPO, including PKC based on the observation that PMA also stimulates MPO release (28-Rajkovic, 1986). The PMA-induced degranulation was also impaired in neutrophils from cirrhotic patients (28-Rajkovic, 1986), as well in our study (data not shown). Unexpectedly, another important family of MAP-kinases, ERK1/2, whose activation was strongly impaired in neutrophils of cirrhotic patients, does not seem to regulate MPO release. This is supported by the fact that the pharmacological blockade of the ERK1/2 signaling pathway did not affect exocytosis of primary granules, in agreement with other studies (39-Moscai, 2000). However, ERK1/2 regulated approximately 30% of the fMLP-induced respiratory burst of healthy neutrophils (Fig. 4C) suggesting that the deficient ERK activation observed here in patients neutrophils may partially contribute to the defective generation of ROS previously reported (8-Rolas, 2013). In this study, 90% of the patients which were defective for the MPO release by neutrophils exhibited a strongly deficient superoxide production (approximately 30-35% of control values) in agreement of our previous works (8-Rolas, 2013). The defective NADPH oxidase activity

of neutrophils may presumably result from the deficient activation of the AKT and p38-MAPK since both protein kinases have been shown phosphorylate different sites of the NADPH oxidase component p47<sup>phox</sup>, respectively S304/S328 (49-Chen, 2003) and S345 (50-EL Benna, 1996). The serine 345 of p47<sup>phox</sup> is a MAP-Kinase phosphorylation site that has been shown to be also phosphorylated in healthy neutrophils treated with the TLR7/8 agonist CL097 a (40-Makni, 2012). This phosphorylation contributes to increase the NADPH oxidase activity of healthy neutrophils (40-Makni, 2012). Based on this finding and our observation that p38-MAPK is a common effector of both MPO release and ROS production of neutrophils, we wondered whether TLR7/8 activation could improve MPO release from patients' neutrophils. Interestingly, CL097 restored substantial fMLP-induced MPO release from patients' neutrophils. This original and promising CL097 property may be related to its ability to stimulate p38-MAPK and to maintain fMLP-induced p38-MAPK activation whereas in the absence of CL097, p38-MAP is transiently activated (Fig. 5). These data strongly suggest that TLR7/8 agonists may represent promising candidates to improve neutrophil defense activities in cirrhotic and immuno-depressed patients. In this view, it is worth noting that CL097 is able to restore the production of G-CSF that was previously inhibited in monocytes under the action of INF $\alpha$ , a cytokine that causes neutropenia (Tajuddin T, 2010).

In conclusion, this study provides evidence that advanced alcohol cirrhosis is associated with a severe down-regulation of three major signaling effectors in neutrophils AKT, p38-MAP kinases and ERK1/2, and a defective MPO release related to the two former deficient signaling pathways. These deficiencies, together with our previously reported deficient respiratory burst of patient neutrophils may further aggravate patient' susceptibility to bacterial infection. Interestingly, the defective MPO degranulation occurred without alteration of signaling effectors and MPO expression, which raises perspectives to improve neutrophil defense

activities by the use of signaling potentiating agents, as supported here with a TLR7/8 agonist approach.

#### Acknowledgements

#### References

- [1] Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16:42-47.
- [2] Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77: 598-625.
- [3] Nauseef W. Myeloperoxidase in human neutrophil host defense. *Cell Microbiol* 2014;16:1146-1155.
- [4] Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, et al. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis* 2004;57(5):S15.
- [5] El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase Delays Neutrophil Apoptosis Through CD11b/CD18 Integrins and Prolongs Inflammation. *Circ Res* 2008;103:352-359.
- [6] Costa C, Germena G, Hirsch E. Dissection of the interplay between class I PI3Ks and Rac signaling in phagocytic functions. *Scientific World Journal* 2010;10:1826-1839.
- [7] Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 2013;17(3): 638-650.
- [8] Rolas L, Makhezer N, Hadjoudj S, El-Benna J, Djerdjouri B, Elkrif L, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin aggravates the respiratory burst defect of neutrophils from decompensated patients with cirrhosis. *Hepatology* 2013;57(3):1163-1171.
- [9] Dinanuer MC. Disorders of neutrophil function: an overview. *Methods Mol Biol* 2014;1124:501-515.
- [10] Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog* 2015;11(3):e1004651.
- [11] Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG. The Role of

Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function during Acute Inflammation. *Am J Pathol* 2015;185(5):1172-1184.

[12] Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* 2009;373:2223-2233.

[13] Naveau S. Current trend: alcoholic liver diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2006;30:550-553.

[14] Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol*. 2014;20:17756-72.

[15] Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61(6):1385-1396.

[16] Ramaiah SK, Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* 2007;35:757-766.

[17] Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Eng J Med* 2009;25:2758-2769.

[18] Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A. Glutathione peroxidase deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 1999;29: 443-445.

[19] Mookerjee RP<sup>8</sup>, Michelena J<sup>1</sup>, Smyrk TC<sup>9</sup>, Buob D<sup>10</sup>, Leteurtre E<sup>10</sup>, Rincón D<sup>11</sup>, et al. A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*. 2014 May;146(5):1231-9.

[20]-Taïeb J<sup>1</sup>, Delarche C, Paradis V, Mathurin P, Grenier A, Crestani B, Dehoux M, Thabut D, Gougerot-Pocidalo MA, Poynard T, Chollet-Martin S. Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol*. 2002; 36:342–8. [PubMed: 11867177]

[21] -Harty MW<sup>1</sup>, Muratore CS, Papa EF, Gart MS, Ramm GA, Gregory SH, Tracy TF Jr. Neutrophil depletion blocks early collagen degradation in repairing cholestatic rat livers. *Am J Pathol*. 2010 Mar;176(3):1271-81. doi: 10.2353/ajpath.2010.090527. Epub 2010 Jan 28.

[22] - Kyle J. Eash,<sup>1</sup> Jacquelyn M. Means,<sup>1</sup> Douglas W. White,<sup>2</sup> and Daniel C. Link<sup>1</sup>. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *BLOOD*, 7 MAY 2009 □ VOLUME 113, NUMBER 19

[23] -Singh V, Sharma AK, Narasimhan RL, Bhalla A, Sharma N, Sharma R. Granulocyte colony-stimulating factor in severe alcoholic hepatitis: a randomized pilot study. *Am J Gastroenterol*. 2014 Sep;109(9):1417-23.

[24]- Garg V<sup>1</sup>, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, Sakhuja P, Sarin SK. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology*. 2012 Mar;142(3):505-512.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2011.11.027. Epub 2011 Nov 23

[25] Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246-1256.

[26] Moreau R, Rautou PE. G-CSF Therapy for Severe Alcoholic Hepatitis: Targeting Liver Regeneration or Neutrophil Function?. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1424-1426.

[27] Feliu E, Gougerot MA, Hakim J, Cramer E, Auclair C, Rueff B, et al. Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 1977;7(6):571-577.

[28] Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, in-tracellular killing, and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986;6:252-262.

[29] Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P, Etienne JP. Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear

- leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol* 1992;16(1-2):98-101.
- [30] Garfia C, Garcia-Ruiz I, Solis-Herruzo JA. Deficient phospholipase C activity in blood polymorphonuclear neutrophils from patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2004
- [31] Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D, Zak J, et al. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:7661-7665.
- [32] Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology* 2007;46:831-840.
- [33] Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA, Jalan R. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol*. 2008 Jun;48(6):945-51.
- [34] Ward PA. Role of C5 activation products in sepsis. *ScientificWorld Journal* 2010; 10:2395-2402.
- [35] Markwick LJ, Riva A, Ryan JM, Cooksley H, Palma E, Tranah TH, Manakkat Vijay GK, Vergis N, Thursz M, Evans A, Wright G, Tarff S, O'Grady J, Williams R, Shawcross DL, Chokshi S. Blockade of PD1 and TIM3 restores innate and adaptive immunity in patients with acute alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*. 2015;148:590-602
- [36] Juttner B, Younes A, Weissig A, Ahrens J, Becker T, Scheinichen D. Reduced post-operative neutrophil activation in liver transplant recipients suffering from post-hepatic cirrhosis. *Clin Transplant* 2009;23:921-929.
- [37] Paruch S, El-Benna J, Djerdjouri B, Marullo S, Perianin A. A role of p44/42 mitogen-activated protein kinases in formyl-peptide receptor-mediated phospholipase D activity and oxidant production. *FASEB J* 2006;20:142-144.
- [38] Patel S, Djerdjouri B, Raoul-Des-Essarts Y, Dang PM, El-Benna J, Perianin A. Protein kinase B (AKT) mediates phospholipase D activation via ERK1/2 and promotes respiratory burst parameters in formyl-peptide-stimulated neutrophil-like HL-60 cells. *J Biol Chem* 2010;285: 32055-32063.
- [39] Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, Ligeti E. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol* 2000;164:4321-4331.
- [40] Makni-Maalej K, Boussetta T, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. The TLR7/8 agonist CL097 primes N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: critical role of p47<sup>phox</sup> phosphorylation and the proline isomerase Pin1. *J Immunol*. 2012 Nov 1;189(9):4657-65. doi: 10.4049/jimmunol.1201007. Epub 2012 Sep 21.
- [41] Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009;360:2758-2769.
- [42] Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 2013;144:1426-1437.
- [43] Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Frances R, Shah N, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:574-581.
- [44] Shawcross DL, Wright GA, Stadlbauer V, Hodges SJ, Davies NA, Wheeler-Jones C, et al. Ammonia impairs neutrophil phagocytic function in liver disease. *Hepatology*. 2008 ; 48(4):1202-12.
- [45] Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312(5992):315-321.
- [46] Tang W, Zhang Y, Xu W, Harden TK, Sondek J, Sun L, et al. A PLC $\beta$ /PI3K $\gamma$ -GSK3 signaling pathway regulates cofilin phosphatase slingshot2 and neutrophil polarization and chemotaxis. *Dev Cell* 2011;21(6):1038-1050.

[47] Chiariello M, Vaqué JP, Crespo P, Gutkind JS. Activation of Ras and Rho GTPases and MAP Kinases by G-protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 2010; 661:137-50.

[48] Lee SB, Shin SH, Hepler JR, Gilman AG, Rhee SG. Activation of phospholipase C-beta 2 mutants by G protein alpha q and beta gamma subunits. *J Biol Chem* 1993;268:25952-25957.

[49] Tazi KA, Quioc JJ, Saada V, Bezeaud A, Lebrech D, Moreau R. Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J Hepatol* 2006;45(2):280-9.

[50] Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2006;2:98-108.

[51] Bertram A, Ley K. Protein Kinase C Isoforms in Neutrophil Adhesion and Activation. *Arch Immunol Ther Exp* 2011;59:79-87.

[52]- Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB, McLeish KR. Akt phosphorylates p47<sup>phox</sup> and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol*. 2003 May 15;170(10):5302-8.

[53]- El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47<sup>phox</sup> as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:6374-6378

54- Tajuddin T, Ryan EJ, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C. Interferon- $\alpha$  suppressed granulocyte colony stimulating factor production is reversed by CL097, a TLR7/8 agonist. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 25(12):1883-90.

## Figure legends

**Fig. 1. Impaired fMLP-induced MPO release in neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis.** Neutrophils from controls and patients with cirrhosis were pretreated in the absence (A) or presence (B) of cytochalasin B (5  $\mu\text{g/mL}$ ; 5 minutes) prior stimulation with fMLP (1  $\mu\text{M}$ ; 2 min) MPO activity measured in supernatant and expressed as OD over 3min. (C) MPO activity was measured in neutrophil homogenates and is expressed as OD over 3min ( $n=14$  in each group;  $*p < 0.05$  versus control). (D-E) Resting neutrophils ( $2 \times 10^6$  cells) from controls and patients were prepared in *Laemmli* buffer, analyzed by western-blot using specific antibodies. Bands of interest were quantified and expressed as percentage of the actin level ( $n=13$  in each group).

**Fig. 2. Impaired fMLP-induced activation of signaling pathways in neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis.** (A) Neutrophils from controls and patients with cirrhosis were stimulated with fMLP (1  $\mu\text{M}$ ; 1min). (B-D) The phosphorylation of AKT(S473), p38-MAPKs and p44/42-MAPKs (ERK1/2) were quantified and expressed as the percentage of control values obtained with fMLP ( $n=4-6$  in each group;  $*p < 0.05$  versus control).

**Fig. 3. Comparison of the expression of signaling effectors and fPR in neutrophils of healthy and patients.** (C-D) Neutrophils from control and patients with cirrhosis were pelleted and disrupted in Trizol buffer for protein extraction. The protein expression was studied by western-blot and the protein of interest was quantified and expressed as percentage of control or actin level ( $n=7$  in each group).

**Fig. 4. fMLP-induced release of MPO from neutrophils involved AKT and**

**p38-MAPK but not ERK1/2.** (A-C) Healthy neutrophils were pretreated for 20 min in the absence (control) and presence of various concentrations of the antagonist of AKT (AKTib1/2), p38-MAPK (SB202190) or ERK1/2 (UO126), then with cytochalasin B for 5min. Cells were then stimulated with fMLP (1  $\mu\text{M}$ , 2 min) and the MPO release was quantified and expressed as the percentage of control fMLP values ( $n=6$ ;  $*p < 0.05$  versus control).

**Fig. 5. The TLR7/8 agonist CL097 potentiated fMLP-induced p38-MAPK activation and MPO release from neutrophils of cirrhotic patients.** Neutrophils from cirrhotic patients were pretreated for 15 min in the absence (control) and presence of various concentrations of the TLR7/8 agonist CL097 (0.5-2  $\mu\text{g/ml}$ ), then stimulated with fMLP (1  $\mu\text{M}$ ) for various times. (A) The phosphorylation of p38-MAP kinase was analyzed by western-blot. Phospho-p38-MAPK was quantified and expressed as percentage of maximal control values obtained with fMLP (data representative of 3 experiments). (B) The MPO release was quantified and expressed as the percentage of control values obtained with fMLP ( $n=3$ ;  $*p < 0.05$  versus control).

**Fig. 6. Proposed model for fMLP-induced MPO release via the AKT/MAPK-signaling pathways in human neutrophils from healthy donors and cirrhotic patients.** Stimulation of neutrophils by fMLP via its specific G-protein-coupled receptor (fPR) induces a rapid activation of the AKT and p38-MAPK signaling, which in turn, contributes to MPO release. In patients with alcoholic cirrhosis, MPO release is decreased as a result of a deficient activation of activation of AKT and p38-MAPK.

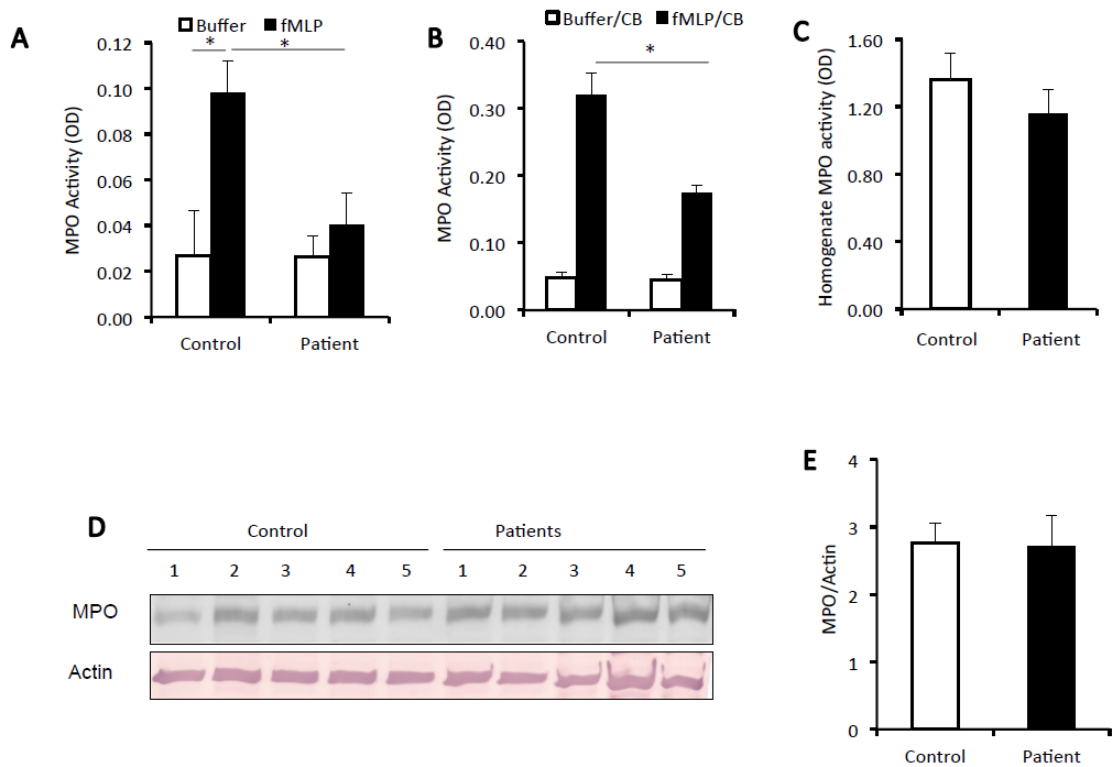
Table 1. Characteristics of Patients

Variable	
NO. of Patients	35
Age, years	58 ± 2
Female/Male	10/25
Ascite, n (%)	24 (67)
HCC, n (%)	0 (0)
Encephalopathy, n (%)	11 (31)
Serum albumin, g/L	24.82 ± 1.14
Serum bilirubin, $\mu$ mol/L	141.89 ± 23.49
Prothrombin time, %	49.24 ± 2.67
International normalized ratio	1.71 ± 0.079
Serum creatinine, $\mu$ mol/L	100.96 ± 13.72
Child-Pugh score	10.59 ± 0.29
Child-Pugh class C, n (%)	29 (83)
MELD score	20.14 ± 1.06
CRP (mg/ml)	19±4
White blood cell count, per mm <sup>3</sup>	8.503 ± 0.874
Treatment with $\beta$ -blockers, n (%)	5 (14)

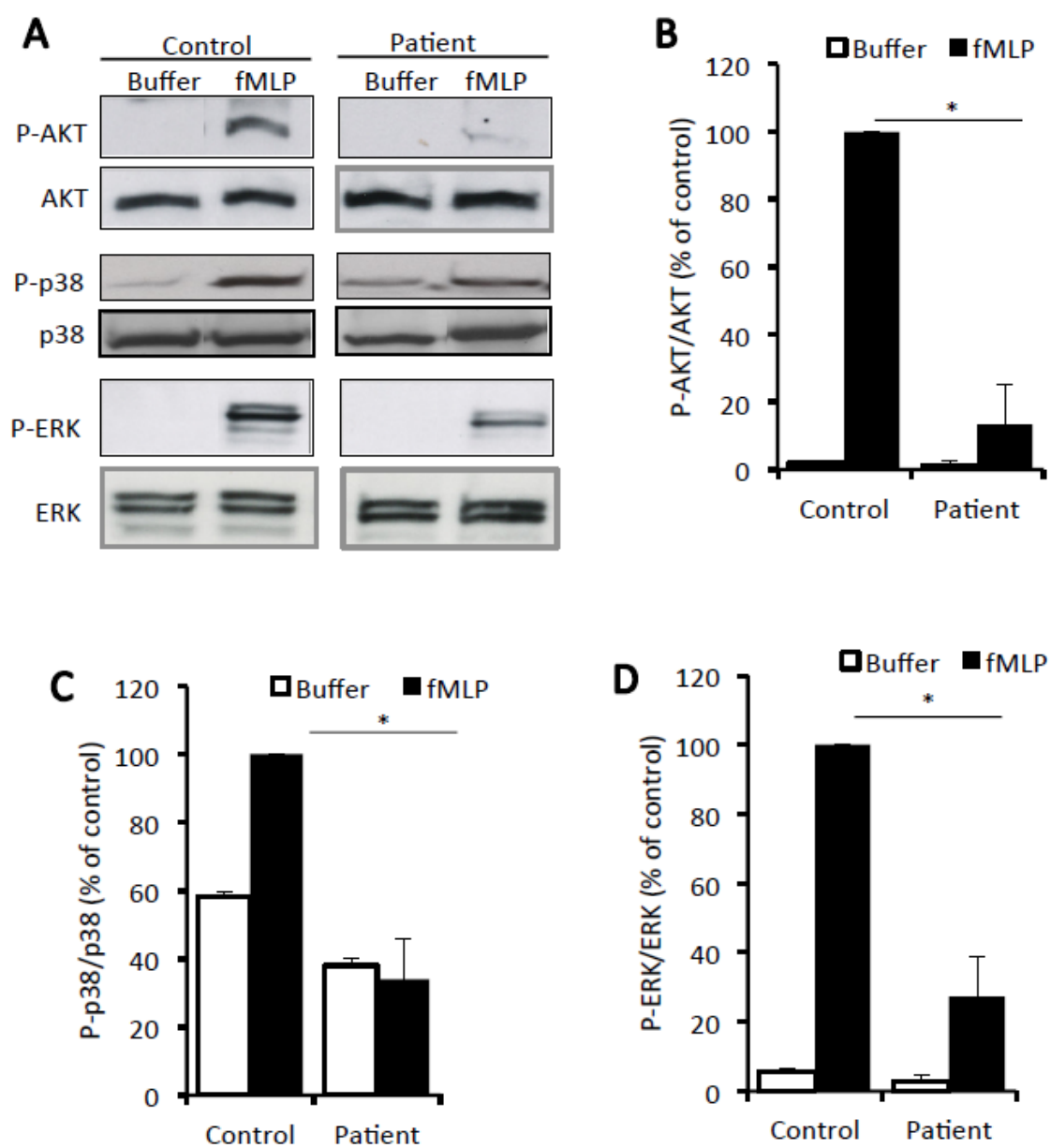
Plus minus values are means  $\pm$  standard error of the mean.  
Abbreviation: MELD, Model of End-Stage Liver Disease.

Figure

Figure 1

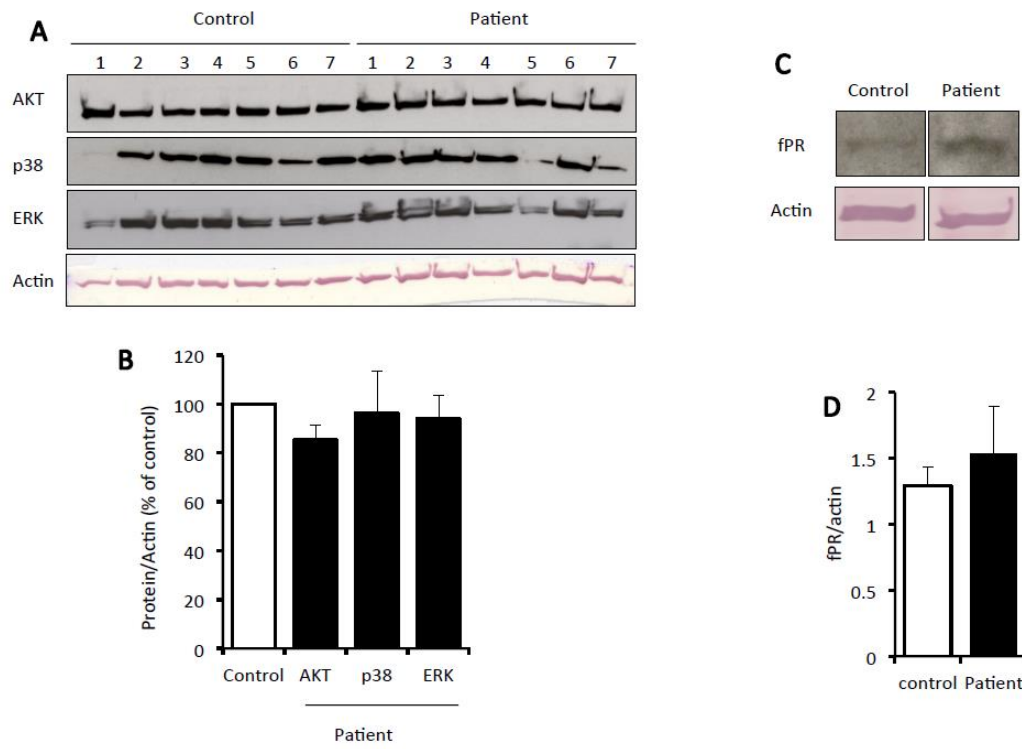


# Figure 2





**Figure 3**



**Figure 4**

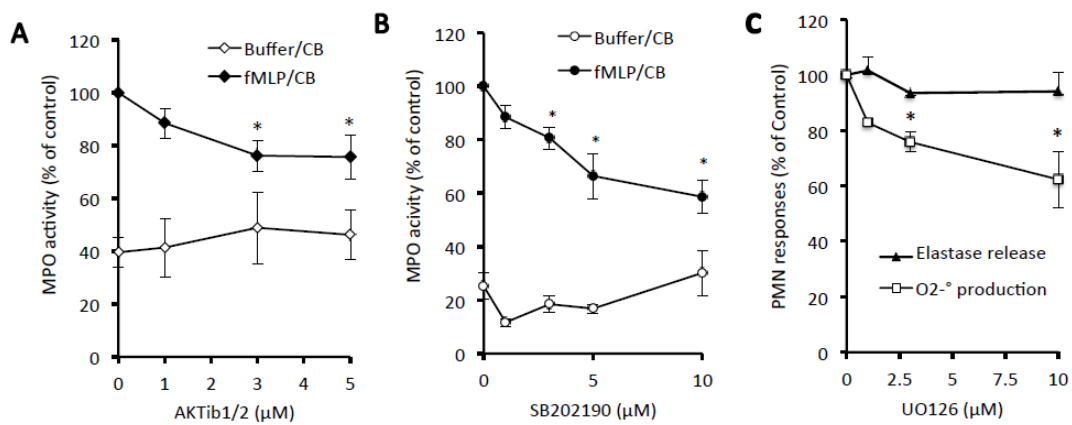


Figure 5

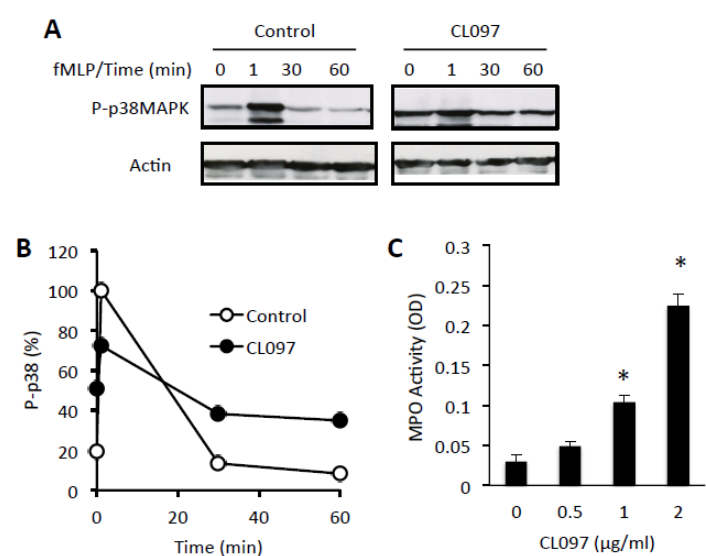
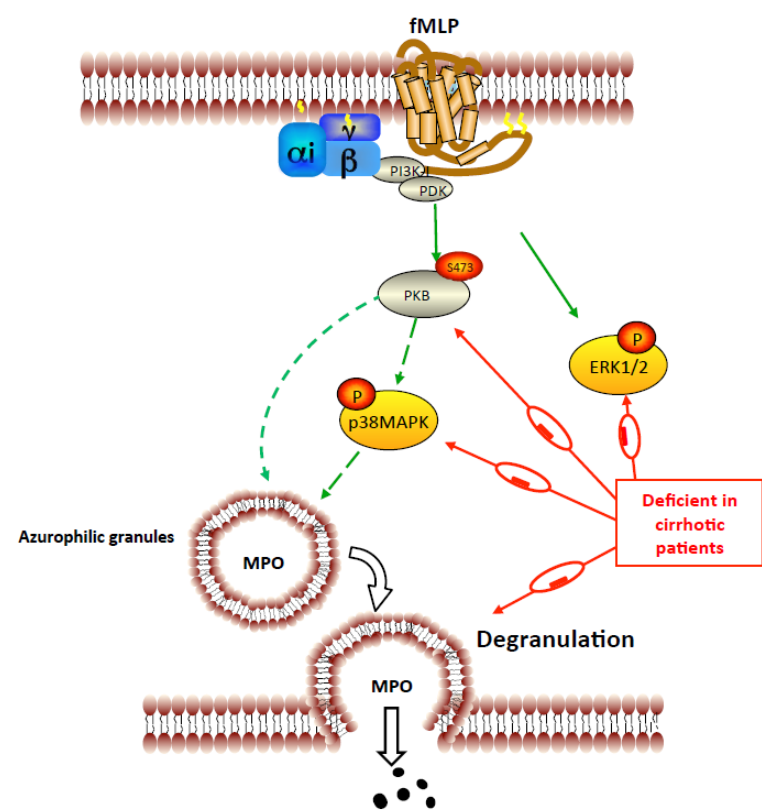


Figure 6



## 2.5 Manuscrit 4 : Le virus O'nyong-nyong interfère avec la signalisation du fPR

### 2.5.1 Le virus O'nyong-nyong interfere avec les voies de signalisations dépendantes d'AKT/MAPK induite par le fMLP et inhibe la production de FRO des cellules HEK

a) Lettre de l'éditeur

#### PLOS Pathogens

O'nyong-nyong virus interferes with formylpeptide receptor-mediated Protein kinase B(AKT)/MAP kinases signaling and inhibits oxidant production in human embryonic kidney cells  
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PPATHOGENS-D-14-01887
Full Title:	O'nyong-nyong virus interferes with formylpeptide receptor-mediated Protein kinase B(AKT)/MAP kinases signaling and inhibits oxidant production in human embryonic kidney cells
Article Type:	Presubmission Inquiry
Corresponding Author:	Axel Perianin INSERM UMRS1149 PARIS, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	INSERM UMRS1149
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Loïc Rolas

**A) A COVER LETTER** of approximately 600 words that provides brief answers to the following questions:

**1. What is the scientific question you are addressing?**

Alphavirus such as O'nyong-nyong virus (ONNV) and its closely related Chikungunya virus are responsible for large-scale epidemics of debilitating arthritis and myositis with severe clinical cases including deaths. Alphaviruses infect many tissues (bone, muscle, joint synovium, and more rarely the brain) where infection is associated with leukocyte infiltration. Despite robust antiviral host cell responses, alphaviruses mobilized interference processes inhibiting JAK/STAT signaling mediated by interferon receptors. However, the impact of alphaviruses on signaling and immune cell responses mediated by other important membrane receptors, G-protein-coupled receptors (GPCR), remains unknown.

**Our question** was to examine whether O'nyong nyong virus (ONNV) alters the activation of major internal signaling effectors and production of reactive oxygen species (ROS) mediated by a GPCR of the innate immune response, the formylpeptide receptor (fPR) expressed in HEK293 cells.

**2. What is the key finding that answers this question?**

HEK-fPR cell infection with a low virus input (MOI equivalent of 0.1) for 36 hours blocked the activation of protein kinase B (AKT) p-38-MAP kinases and p44/42-MAP kinases (ERK1/2) mediated through fPR activation, without altering fPR expression. However, basal activation state of the three kinases was not altered. ROS production induced via fPR activation was also inhibited.

**3. What is the nature of the evidence you provide in support of your conclusion?**

Our conclusion is supported mainly by biochemical, biological evidences obtained from an in vitro cellular model of ONNV infection.

**4. What are the three most recently published papers that are relevant to this question?**

There is no published paper relevant to alphavirus impact on signaling and immune responses mediated by fPR or other GPCRs. However, many reviews and papers exist on arthritogenic alphaviruses, particularly on the recent Chikungunya outbreaks in islands in the Indian ocean (see references 2-4 with the abstract).

**5. What significance do your results have for the field?**

GPCR signaling thus emerge as a novel field for exploring biochemical mechanisms by which alphaviruses escape from host anti-infectious defense systems and mechanisms of viral pathogenesis.

**6. What significance do your results have for the broader community in the area of Pathogens and/or Pathogenesis?**

Our results should be encouraging for the study of other Alphavirus (Chikungunya Virus, Ross river, Sindbis virus, Mayaro virus) that cause similar arthritic and myositis symptoms. In addition, given the biological importance of GPCRs, our models should be useful for understanding the molecular basis of many dysfunctions in tissues infected by alphaviruses, and mechanisms of pathogenesis.

**7. What other novel findings do you present?**

- We further showed that activation of the three protein kinases induced by a direct activator

of PKC (i.e. phorbol myristate acetate, PMA), was not altered, suggesting that the kinases are not directly impacted. However, PMA-induced ROS production PMA was inhibited.

- FACS data showing fPR1 expression at low virus input of MOI of 0.1 (no effect) and 0.4 (a weak decrease of 30%).

- Data showing a dramatic decrease of HEK cell proliferation by ONNV (MOI of 0.1 and 0.4).

#### **8. Is there additional information that we should take into account?**

Biological importance of fPR : this receptor is initially known to be expressed by leukocytes (including monocytes and macrophages which are targets of alphaviruses) and regulate various defense activities (chemotaxis, release of lysosomal enzymes and production of microbicidal reactive oxygen species via NADPH oxydase). FPR or variants (fPRL1, fPRL2) are also expressed by non-phagocytic cells targeted by alphaviruses (hepatocytes, astrocytes, microglia cells, microvascular endothelial cells, epithelial cells in central nervous systems, glioma cells) where it exerts pleiotropic roles, which may of interest in studying alphavirus pathogenesis.



## Referenced Abstract (293 words)

O'nyong-nyong virus (ONNV) and its closely related Chikungunya virus (1) are mosquito-transmitted pathogens responsible for large-scale explosive epidemics of debilitating arthritis and myositis with severe clinical cases and atypical manifestations including deaths (2-4). These alphaviruses infect many organs (bone, muscle, joint synovium, and more rarely the brain) where infection is associated with infiltration of leukocytes. Although infected cells developed rapidly pro-inflammatory and antiviral responses, virus dissemination is not efficiently eradicated due in part to the fact several alphaviruses interfere with the antiviral signaling pathways JAK/STAT mediated by interferon receptor (5). It remains not known whether alphaviruses impact signaling pathways and defense activities mediated by other important membrane receptors such as G-protein-coupled receptors. However, these receptors constitute the largest family of signaling molecules and regulate many biological responses (6)

In this study, we took profit of the highly infectable cell line HEK293 cells stably expressing a G-protein-coupled receptor (GPCR), the antimicrobial formylpeptide receptor fPR1 (7) to explore ONNV impact on the activation of major internal signaling effectors detected by western-blot and generation of microbicidal reactive oxygen species (ROS) via NADPH oxidase (8), assessed by chemiluminescence (8). Infection of HEK-fPR cells with low ONNV input (MOI equivalent of 0.1) for 36 H dramatically inhibited cell proliferation without altering fPR1 expression. ONNV abolished the activation of protein kinase B (AKT), p38-MAP kinase and p42/44 MAP kinases mediated via fPR stimulation. By contrast, ONNV infection neither alter the basal activation state of the three protein kinases nor their activation induced by a direct protein kinase C activator, phorbol myristate acetate (PMA). However, ROS production induced via both fPR activation and PMA was impaired.

These results reveal novel innate immune interference mechanisms mobilized by ONNV, affecting early fPR1-mediated signaling events, and ROS production, possibly contributing to pathological manifestations.

## References

- 1- Levinson RS., Strauss JH, and Strauss EG. Complete sequence of the genomic RNA of O'nyong-nyong virus and its use in the construction of alphavirus phylogenetic trees. *Virology* 1990; 175: 110-123.
- 2- Toivanen A, Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? *Current Opinion in Rheumatology* 2008; 20: 486-490.
- 3- Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses-an overview *Nature Reviews Rheumatology* 2012; 8: 420-9.
- 4- Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 2007; 88: 2363-77.
- 5- Fros JJ, van der Maten E, Vlak JM, Pijlman GP. The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling. *J Virol* 2013; 87:10394-400.
- 6- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1256-72.

- 7- Paruch S, El-Benna J, Djerdjouri B, Marullo S, Perianin A. A role of p44/42 mitogen-activated protein kinases in formyl-peptide receptor-mediated phospholipase D activity and oxidant production. *FASEB J* 2006; 20: 142-4.
- 8- Bedard K, Krause KH. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.

b) Article

**O'nyong-nyong Virus Interference with the G-protein-coupled Formylpeptide Receptor fPR Signaling and production of Reactive Oxygen Species in Human Embryonic Kidney Cells and Monocytes**

**Loïc Rolas<sup>1</sup>, Abdelali Boussif<sup>1</sup>, Philippe Desprès<sup>2</sup>, Philippe Gasque<sup>3</sup>, and Axel Périanin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM UMR-S-1149), Centre de Recherche sur l'Inflammation, Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS ERL 8252, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'excellence INFLAMEX, Paris, France; and <sup>2</sup>Immunopathology and Infection Research Grouping (IRG), EA4517, University of La Réunion, CHU Felix Guyon and CYROI, St Denis, La Réunion, France.

Running title : ONNV interferes with GPCR signaling

Word counts : Abstract : 289 ; Text : 3425

- Corresponding author: Dr Axel PERIANIN, INSERM U1149 , Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. □ Tel: 33-157277473; Fax: 33-157277411;

Email: [axel.perianin@inserm.fr](mailto:axel.perianin@inserm.fr)

- Financial support. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), The Labex Inflammex and the Integration of Chikungunya Research (ICRES).

- Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts

## **Abstract (289 words)**

O'nyong-nyong virus (ONNV) and its closely related Chikungunya virus are mosquito-transmitted pathogens responsible for large-scale explosive epidemics of debilitating arthritis and myositis with severe clinical cases and atypical manifestations including deaths. These alphaviruses infect many organs (bone, muscle, joint synovium, and more rarely the brain) where infection is associated with infiltration of leukocytes. Although infected cells developed rapid pro-inflammatory and antiviral responses, virus dissemination is not efficiently eradicated due in part to viral interference with the interferon receptor-mediated antiviral signaling pathway JAK/STAT. However, it remains not known whether alphaviruses impact G-protein-coupled receptor (GPCR) signaling. GPCR represent the largest family of signaling molecules and regulate a great variety of biological responses including the production of microbicidal reactive oxygen species (ROS) via NADPH oxidase.

In this study, we explored the impact of ONNV on major internal signaling effectors and ROS production mediated via activation of the widely expressed G-protein-coupled formylpeptide receptor fPR in HEK293 cells stably expressing fPR and human monocytes. Infection of HEK-fPR cells with a low ONNV input (equivalent MOI of 0.1) for 40 H dramatically inhibited cell proliferation without altering fPR expression. However, ONNV infection abolished fPR-mediated activation of protein kinase B (AKT), p38-MAP kinase and p42/44 MAP kinases detected by western-blot. By contrast, ONNV infection neither alter the basal activation of the three protein kinases nor their activation induced by a direct protein kinase C activator, phorbol myristate acetate (PMA). However, ROS production induced via both fPR and PMA was impaired. Infection of primary human monocytes by ONNV (MOI of 0.4) inhibited both fPR- and PMA-mediated signaling events, as well ROS production. These results reveal novel innate immune interference mechanisms mobilized by ONNV, affecting early fPR-mediated signaling events and ROS production, possibly contributing to pathological manifestations.

Key-words: Alphavirus – GPCR - Signaling - Reactive oxygen species – NADPH oxidase



## Introduction

Alphaviruses such as O'Nyong-nyong virus (ONNV) and its closely related virus, Chikungunya virus (ChikV) (1-Levinson, 1990; 2-Khan et al, 2002) are responsible of large scale epidemics in west and south Africa, Southeast Asia and islands in the Indian ocean (reviewed in ref 3: Powers, 2007, 4- Toivanen 2008; 5-Suhrbier, 2012; 6-Thiberville, 2013). ONNV and ChikV are transmitted by bites of infected mosquito and cause very similar clinical symptoms characterized by abrupt illness with fever, vomiting, maculopapular rash, and debilitating arthralgia/arthritis affecting fingers, wrists, elbows, toes, ankles, and knees (7-Peters C, 1990, 8- Bodenmann P, 2006; 9-Pialoux G, 2007). The recent epidemic of ChikV in the French island of La Reunion in the Indian ocean in 2005-2006 has revealed exceptional forms of the disease (e.g., mother-to-child transmission associated with encephalitis, deaths and extensive bullous eruption) and severe complications in adults such as persistent arthralgia, destructive arthritis, lethal hepatitis, autoimmune neurologic pathologies and cardiologic manifestations (10- Staikowski F, 2009; 11-Jansen KA, 2013; 12-Lenglet 2006; 9-Pilaux, 2007; 13- Jaffar-Bandjee 2010). Atypical clinical complications such as acute nephritis, and meningoencephalitis have also been reported (8-Bodenman P, 2006; 14-Lemant J, 2008; 15- Solanki BS, 2007). In contrast to the ChikV outbreaks, the epidemic by ONNV described since the 1960s in Africa, remained poorly studied due to rare episodes of infection during the last 35 years (16-Seymour RL, 2013; 17- Kiwanuka N, 1999; 18- Posey DL, 2005).

Alphavirus infect various cell types including fibroblasts, endothelial cells, and macrophages (4-Toivanen 2008; 5-Suhrbier, 2012; 6-Thiberville, 2013), tissues such as liver and spleen which are considered sites of primary replication and dissemination (19-Labadie K, 2006), as well bone, muscle, joint seals and the brain where infection is associated with infiltration of leukocytes including monocytes/macrophages that are considered as reservoirs of the virus and

development of pro-inflammatory responses. Recruited and resident immune cells respond to inflammatory stimuli through G-protein- and kinase-coupled receptors, and subsequently mount rapid proinflammatory and antiviral responses characterized in part by production of interferon (INF) of type I/II (16- Seymour RL, 2013 ; 20-Chilte C, 2010; 21- Brehin AC, 2009). However, these beneficial innate immune responses may not be efficient to fully eradicate virus dissemination. Interference with type I/II interferon-stimulated JAK/Stat1/2 signaling pathway has been recently described for several Alphaviruses (22-Frs 2010; 23-Fros, 2013), thus impairing INF production. Whether, alphaviruses alter cellular responses mediated by other important families of membrane receptors such as G-protein-coupled receptors (GPCR) is not known. These receptors constitute the largest class of signaling molecules with approximately eight hundreds GPCRs identified (24-Fredricksson, 2013) and regulate a great variety of cell responses, which may be of interest in understanding the mechanisms of viral pathogenicity.

The formyl-peptide receptor, fPR, belongs to the superfamily of G-protein-coupled receptors and was initially found to be expressed by phagocytes (25-Boulay, 1990; 26-Murphy et al, 1996). FPR or variants (fPRL1, fPRL2) were then detected in a great number of human non-phagocytic cells including hepatocytes, astrocytes, microglia cells, T lymphocytes, microvascular endothelial cells, epithelial cells, in central nervous systems and in glioma cells, where it exerts pleiotropic roles (27- Le Y, 2001). fPR is stimulated by formylated bacterial peptides and regulates various anti-infectious responses of phagocytes (28-Fu H, 2006) such as chemotaxis towards tissues infected by micro-organisms, exocytosis of lysosomal enzymes, and a massive production of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) by the NADPH oxidase 2 (NOX2), a phenomenon also called respiratory burst (29- Babior B, 2004). Superoxide anion is at the origin of other reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydrogen radical

(OH<sup>°</sup>) and hypochlorous acid (HCLO<sup>-</sup>) which are potent toxic oxidants for bacteria and virus, and also serve as signaling mediators (33-Halliwell B, 2004). These fPR-mediated defense activities of phagocytes are initiated through activation of a pertussis toxin-sensitive G proteins (Gi) which stimulates various signaling pathways including protein kinases such as protein kinases B (AKT) and C (PKC), tyrosine kinases, and mitogen-activated protein kinases (MAPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR), which all directly or indirectly up-regulate neutrophil ROS production by the phagocyte NADPH oxidase 2 (NOX2) (31-Bokoch GM, 1995; 32-DeLeo FR, 1996); 33-Paruch 2006; 33- Dang 35-Patel 2010, 36-Rolas 2013). So far, the impact of infection by Alphaviruses on GPCR signaling and ROS production remains unknown.

In this study, we used the human embryonic kidney cell line (HEK 293) stably expressing fPR (40-Paruch 2006) and primary human monocytes to examine whether cell infection by ONNV virus (ONNV) alter the activation of major signaling internal effectors such as protein kinase B (PKB or AKT) and MAP Kinase activation, and production of ROS. These responses were induced through fPR stimulation by the bacterial formylated peptide f-Met-Leu-Phe (fMLP), and compared to those induced by a direct activator of protein kinase C, phorbol myristate acetate (PMA). These approaches revealed novel innate immune ONNV interference properties affecting early and late steps of fPR signaling. .

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** ONNV and the mouse serum against the Chikungunia proteins (37-Brehin AC; 2008) were provided by Dr Philippe Desprès (Institut Pasteur, Unité Interactions moléculaires Flavivirus-Hôtes, Paris, France). Antibodies against phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204), phospho-AKT1/2(S473), phospho-p38-MAPK(Thr180/Tyr182) were from Cell Signaling. Rabbit polyclonal anti-ERK1 and peroxidase- or alkaline phosphatase-

conjugated antibodies were from Santa-Cruz Biotechnology. CD14 Microbeads were from Myltenyl Biotec. Materials for electrophoresis were from BioRad. F-Met-Leu-Phe (fMLP), phorbol myristate acetate (PMA), luminol and horseradish peroxidase and other reagents were from Sigma Aldrich.

## Cell culture and Infection

Human embryonic kidney cells (HEK293T) stably expressing the formylpeptide receptor fPR coupled at the C-term with the yellow fluorescent protein (fPR-YFP) (33-Paruch, 2006) were cultured in DMEM containing 10% FCS and 100 µg/ml streptomycin and penicillin. For infection, cells were seeded at the density of 3x10<sup>6</sup> cells in 100 mm plates and infected with ONNV at a concentration of 0.1 and 0.4 particles per cell (equivalent of MOI) for 40 hours. Cells were washed twice with phosphate buffer saline (PBS) and harvested with PBS containing 5 mM EDTA for 6-8 min at 37°C. Cells were washed and suspended in PBS for FACS analysis of fPR-YFP. For ROS production studies, cells were suspended in Hanks balanced salt solution (HBSS), pH 7.4 containing 1.2 mM calcium. Cell viability assessed by the Trypan blue exclusion test after 40 H infection, was about 85-90 %.

Monocytes were isolated from heparinized human blood (10 Units/ml) by a first step of blood centrifugation on a cushion of Ficoll hypaque. Monocytes were immunopurified using anti-CD14 magnetic microbeads (Myltenic Biotec) according to the supplier's instructions. The purified monocytes (96-98%) were cultured in RPMI containing 10% FCS 100 µg/ml antibiotics at the density of 8x10<sup>6</sup> cells in 100 mm plates and infected with ONNV at equivalent MOI of 0.1 and 0.4 for 40 hours. Cells were collected with EDTA as described above with HEK-fPR cells, and suspended in HBBS.

## Electrophoresis and western-blot analysis

Cells were treated and stimulated as described in the figure legends and suspended at 2 × 10<sup>6</sup> cells/200 µl in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 2.5 mM orthovanadate, 2.5

mM EDTA, a cocktail of antiproteases (Complete<sup>TM</sup>, Boehringer), and Laemmli lysing buffer as described (35-Rolas *et al* 2013). Proteins were denatured (5 min, 95°C), separated by 10% SDS-PAGE, and semi-dry transferred onto a nitrocellulose membrane (Millipore, France). Immunoblotting experiments were performed under standard conditions using antibodies against the phosphorylated form of p44/42-MAPK(Thr202/Tyr204), p38-MAPK((Thr180/Tyr182) and AKT(S473). Luminol-enhanced chemiluminescence was used for detection of horse peroxidase-conjugated secondary antibody. In some experiments, membranes were washed and subsequently reprobed with antibodies of interest, and detection with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies was performed using nitroblue tetrazolium (NBT) as substrate. The quantification of phosphorylated proteins was performed with the Image J 1.62 software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### ROS production

ROS production was measured using a luminol-amplified chemiluminescence assay with minor modifications (36-Rolas *et al*, 2013). Briefly, 0.5 x10<sup>6</sup> cells in 0.5ml HBSS containing 1 unit horseradish peroxidase and 10µM luminol were incubated in 5-ml plastic tube in a thermostated (37°C) bioluminometer (EGG Berthold Autolumat LB953). ROS production was monitored for 10 min in the absence of stimuli, then in the presence of the fPR activator fMLP (1 µM) or 100 nM phorbol myristate acetate (PMA). The peak value of the chemiluminescence response obtained with fMLP or PMA was used to quantify ROS production, after subtraction of basal values.

### Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data represent the mean ± SEM of at least three experiments. Differences between means were identified by using Student's paired *t* test. Statistically significant differences were calculated with a threshold of *P* < 0.05.

## RESULTS

### ONNV strongly impaired HEK293T cell proliferation with a moderate reduction of fPR expression.

HEK293T cells stably expressing the G-protein coupled receptor fPR were cultured in the absence (control) or presence of ONNV at a concentration of 0.1 and 0.4 particles per cell (equivalent of MOI) for 40H. This treatment strongly reduced the number of cells by 50 and 65 % respectively, in comparison to control (Figure 1A), which is consistent with the virus ability to inhibit cell proliferation. Since replication of alphaviruses in mammalian cells usually generate dsRNA which lead to inhibition of host gene expression (38- Kuhn, RJ, 2007), the effects of ONNV infection was examined on fPR expression. Infection of cells with ONNV at MOI of 0.1 did not alter the fPR expression, whereas a weak inhibition of 30% (*P*<0.05) was observed with cells infected with ONNV at MOI of 0.4 (Fig. 1B and C).

### Infection of HEK-fPR cells with ONNV prevents the activation AKT and MAPK kinases mediated by fPR but not by PMA.

fPR activation in phagocytes by the formylpeptide f-Met-Leu-Phe (fMLP) triggers a rapid and transient activation of various major protein kinases amongst which protein kinase B (AKT1/2), MAP kinases and PKC, which regulate various defense functions (33-Paruch 2006, 34-Dang 2006, 35-Patel 2010, 36-Rolas 2013). In HEK-fPR cells, fMLP also induced similar activation of these kinases (33-Paruch 2006). To determine whether ONNV alter these signaling effectors, the phosphorylation state of protein kinases was examined by western-blot experiments. As shown in figure 2A, stimulation of control cells by fMLP induced a rapid phosphorylation of AKT, p38-MAPK and ERK1/2 (p44/42 MAPK) compared to basal values. Infection of HEK cells by ONNV at MOI of 0.1 which preserved fPR expression (Figure 1), blocked the activation of the three signaling effectors induced by fMLP (Figure 2B-D), whereas the basal phosphorylation

state of the kinases was not altered. Interestingly, ONNV infection did not alter the phosphorylation of the signaling effectors induced by phorbol myristate acetate (PMA) a direct protein kinase C (PKC) activator (Figure 2E), further indicating that these ONNV-infected HEK-fPR were viable despite a marked expression of the viral proteins pE2 and E2.

#### **ONNV inhibited fMLP- and PMA-induced ROS production by HEK-fPR cells**

fPR regulates various defense activities of phagocytes among which a massive ROS production via the NADPH oxidase (NOX). This phenomenon termed respiratory burst (29-Babior, 2004) participate to their microbicidal activity (36-Rolas). Kidney cells also express a similar NADPH oxidase activity which is believed to play a role in signaling, cell growth, oxygen sensing and inflammatory responses (39-Shiose et al 2001; 40-Bedard K, 2007). To examine whether ONNV alters ROS production, HEK-fPR cells were infected with ONNV at MOI of 0.1 which did not alter fPR expression (Figure 2). Stimulation of control HEK-fPR cells with fMLP (1  $\mu$ M) induced a rapid and transient production of ROS peaking at 5 min, which was strongly inhibited in infected cells (Figure 3,  $P < 0.05$ ). ROS production can be also stimulated by the direct PKC activator PMA, thus by-passing fPR-mediated signaling. Interestingly, the PMA-induced ROS production response was also inhibited in ONNV-infected cells ( $P < 0.05$ ), but at lower extent relative to the fMLP response (Figure 3). These data further indicate that the interference process developed by ONNV may impact the PKC/NADPH oxidase complex.

#### **Monocyte infection by ONNV inhibits fPR and PMA-induced signaling and ROS production.**

To examine the relevance of ONNV effects in primary phagocytes, we used human monocytes which naturally express fPR and have been reported to be infected by the

Alphavirus Chikungunia (41-Sourisseau). Stimulation of noninfected monocytes by fMLP induced a rapid and transient phosphorylation of AKT, ERK1/2 and p38-MAPK (Figure 4A-D) similar to that observed in HEK cells (Fig 2). Treatment of monocytes with ONNV (equivalent MOI of 0.1 and 0.4) for 40 H did induce infection as revealed by significant production of viral proteins detected in cells treated with ONNV at MOI of 0.4 (Figure 4E). In ONNV-infected monocytes, fMLP-induced phosphorylation of AKT and MAPK was significantly impaired (Figure 4F-G), whereas basal phosphorylation was not altered. Interestingly, the PMA-induced phosphorylation of effectors was also inhibited, in contrast to that observed HEK cells (Figure 2).

Stimulation of fPR in human monocytes induced a massive production of ROS (42-Allanore 2005). This respiratory burst was also inhibited in ONNV-infected cells, as well that induced by PMA (Figure 5). To further gain insight into the mechanisms of ONNV interference, respiratory burst of monocytes was also induced via another pro-inflammatory GPCR, C5a receptor (C5aR), and by mastoparan, a wasp venom peptide toxin that directly stimulates trimeric Gi proteins (43-Higashijima; 44-Perianin). Under these conditions, monocyte respiratory burst was also inhibited after infection (Figure 5).

## **DISCUSSION**

This study provides new insights into the mechanisms by which ONNV interferes with intracellular signaling and cellular functions. Using human monocytes and HEK293 cells expressing a GPCR prototype, fPR, we identified three major signaling effectors, AKT, p38-MAPK and ERK1/2, whose activation mediated via fPR was inhibited in cell infected by ONNV. Remarkably, in HEK cells ONNV neither inhibited basal activation of these three effectors nor their activation induced by the direct PKC activator, PMA. These results indicate that ONNV-induced biochemical alterations do not directly affect PKC, AKT and MAPK but may result from alterations of early upstream events

mediated via fPR (Figure 6). To our knowledge, this type of signaling impairment has not been previously described with alphaviruses. However, a similar interference pattern was observed with the *Bordetella pertussis* toxin known inactivates the  $\alpha$ -subunit of trimeric Gi-proteins of the Gi/o type, and thus inhibits fMLP- but not PMA-induced signaling events in neutrophils (44-Périanin, 1989). Possible alterations of the G-protein coupled to fPR by ONNV or viral components would explain the simultaneous blockade of both MAP kinases and AKT signaling since the activation of the p38-MAPK module (MLK3-MKK3/6-p38-MAPK) via GPCRs involves  $G_{i\alpha}$  subunit (46-Yamauchi, 2000) whereas the activation of p44/42-MAPK module (MEK1-RAF 1/2-ERK1/2) is dependent on the  $G_{\beta\gamma}$  subunit (47-Guntking JS, 2004). In addition,  $G_{\beta\gamma}$  also activates phosphatidylinositol-3 phosphate kinases (PI3-Kinase  $\gamma$ ) which contributes to AKT activation by phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) (48-Sarbassov, 2005). The deficient p44/42-MAPK phosphorylation may also be explained in part by AKT inhibition since we recently showed that fPR mediates the interaction of AKT with ERK1/2 and contributes to ERK activation (35-Patel 2010). Alternatively, the inactivation of fPR signaling cascade by ONNV may involve alterations of the fPR at the plasma membrane but not its expression, since it was not altered by ONNV at MOI of 0.1 (Figure 2). The ability of ONNV to impair fPR signaling was confirmed with primary human monocytes but at a lower extent (Figure 4). This difference between the two cell types may likely due to the fact that monocytes were less infected than HEK cells (Figures 2 and 4), in agreement with previous works (41-Sourisseau 2007). Another striking difference was the observation that the PKC(PMA)-induced phosphorylation of the three effectors was impaired in monocytes but not in HEK cells. The reasons for these discrepancies are not known and may be related to difference of effector isoforms, their degree of expression and/or down-regulation of phosphoproteins by phosphatases.

Stimulation of AKT and MAPK in response to fPR activation contributes to ROS production via the superoxide-generating NADPH oxidases (40-Bedard, 2007). As expected from the impairment of these signaling events induced by ONNV, a deficient ROS production was observed in both infected HEK and monocytes (Figure 3 and 5). However, the HEK cell model provides an advantage over monocytes in that it clearly

dissociates at least two distinct mechanisms of viral interference. A first process may impact the motor system NADPH oxidase and/or partners (Figure 6). This is supported by the observation that ONNV inhibited PMA-induced ROS production in HEK cells (Figure 3) while PKC, AKT and MAPK activation was not altered (Figure 2E). In this model, PKC is believed to directly activate NADPH oxidases and/or its partners, which suggests that ONNV may impact the ROS generating motor system. Alternatively, the deficient ROS production may involve a decrease expression of NADPH oxidase components. A second major interference mechanism may involve inhibition of fPR mediated early signaling effectors (AKT, MAP-kinases) in both monocytes (Figure 4) and HEK cells (Figure 2). In this context, the ability of ONNV to inhibit monocyte ROS production induced by the G-protein activator mastoparan, reinforces our hypothesis that ONNV may impact G-protein-dependent signaling, independently of its activation through fPR or the pro-inflammatory receptor C5aR (Figure 5). In monocytes and in other ONNV-infectable phagocytes (macrophages, dendritic cells), ROS are produced in great amounts through NOX2. From the current model of NOX2 activation via fPR (38-Bokoch, 1995 ; 33-Paruch, 2006; 34-Dang, 2006, 35-Patel 2010; 36-Rolas 2013 ), NOX2 activity requires both MAP kinases and AKT which phosphorylate the NOX2 component p47 $phox$ , respectively on serine 345 (34-Dang, 2006), and serine 304/serine 328 (49-Yoyal, 2006). The inhibition of AKT may also inhibit its downstream effector, mammalian target of rapamycin (mTOR), which emerges as a novel signaling effector of NOX2 (36-Rolas, 2013). Consistent with this hypothesis, a defective activation of mTOR (phospho-mTOR) was recently observed in Chikungunia virus-infected MEF cells (50-Joubert PE, 2012) and Vero cells (51-Das I 2014), which may impact gene expression. In HEK cells, the production of ROS is relatively low, mainly due to the NADPH oxidase 4 (NOX4) (39-Shiose A, 2001), and may have physiological functions. NOX4 is also expressed in various cells types including osteoclasts, endothelium, smooth muscle, fibroblasts, keratinocytes, melanoma cells, neurons, monocytes/macrophages (40-Bedard K, 2007) which are also targets of Alphavirus (review in 41-Sourisseau, 2007). It is not known by which precise signaling mechanisms fPR or other GPCR mediates NOX4 activation in HEK cells. However, the involvement of signaling events is suggested by the observation that NOX4 activity was up-regulated by other agonists of GPCR, for

example by angiotensin-II in mesangial cells, as well by other stimuli such as lipopolysaccharide (LPS) in HEK cells, insulin in adipocytes, and in PMA-stimulated vascular endothelial cells (40-Bedard 2007).

The ability of ONNV to inhibit ROS production may potentially impact pleiotropic biological immune responses including NOX2-dependent anti-infectious and antiviral activities of monocytes/macrophages (29-Babior), NOX2-dependent antigen presentation by dendritic cells (52-Savina, 2006) or oxygen sensing by NOX4 in kidney cells (39-Shiose, A 2001; 40-Bedard K, 2007), which may be beneficial to the virus. Inhibition of ROS production may further be beneficial to ONNV via the JAK/STAT signaling pathway, known to be strongly involved in antiviral defense mechanisms via a production of interferon of type 1 (22- Fros, 2010; 23-Fros, 2013). Indeed, this signaling pathway (JAK1/2/STAT1/3) can be stimulated by some GPCRs such as angiotensin receptor (AT1R) and thrombin (PAR) through a mechanism involving RAC1, p67<sup>phox</sup> and ROS production in vascular smooth muscle cells (53- Pelletier S, 2003). This signaling pathway was reported to be inhibited by the nonstructural protein 2 of CHIKV/ONNV (23- Fros J, 2013), which may further protect viruses against the production interferon type  $\alpha/\beta$ . It is not known whether fPR stimulates the production of interferon of type  $\alpha/\beta$ . However, fMLP receptors induces stimulation of STAT3 via a mechanism involving JAK and Raf1 in HEK cells (54-Wu, 2003). Furthermore, stimulation of the fPR isoform fPLR1 induces transactivation epidermal growth factor receptor (EGFR) via a ROS-dependent process which induces the activation of STAT3 and regulates cell proliferation (55-Cattaneo, 2011). In glioma cells and monocytes, stimulation of fPR by fMLP activates STAT3 and three other transcriptional regulators (AKT, p38-MAPK and p44/42 MAPK) and thus up-regulate the proliferation of U87 cells (56- Zhou Y, 2005). Inhibition of these major signaling pathways in HEK cells infected by ONNV may also contribute to inhibit HEK cell proliferation in response to mitochondrial formylated proteins released during necrosis.

En conclusion, this study provides first evidences that ONNV inhibits the activation of major signaling pathways (AKT, p38-MAPK and ERK1/2) mediated by the formylpeptide receptor, and ROS production by NADPH oxidases. Results further suggest two distinct ONNV interference mechanisms; one affecting early transductional events proximal to the G protein coupled to fPR and

the other at the the motor system NADPH oxidases. Given the biological importance of ROS and GPCRs in regulating cell biological responses, these results thus open new insights into the mechanisms of pathogenesis of alphaviruses (Chikungunya virus, Ros River virus, Sindbis virus, Mayaro virus).

## References

- 1- Levinson RS, Strauss JH, and Strauss EG. Complete sequence of the genomic RNA of O'nyong-nyong virus and its use in the construction of alphavirus phylogenetic trees. *Virology* **1990**; 175: 110–123.
- 2- Khan AH, Morita K, Parquet Md Mdel C, Hasebe F, Mathenge EG, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* **2002** ; 83: 3075–3084.
- 3- Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol.* 2007 ;88:2363-77.
- 4-- Toivanen A, Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? *Current Opinion in Rheumatology.* **2008** ; 20 : 486–490.
- 5- Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses-an overview *Nature Reviews Rheumatology*, **2012** ; 8 : 420–429.
- 6-- Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, de Lamballerie X. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res.* **2013**; 99:345-70.
- 7-Peters C, Dalrymple J. Alphaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Fields virology*. 2nd edition. New York: Raven Press. 1990 ; pp. 713–761.
- 8-Bodenmann P, and Genton B. Chikungunya: an epidemic in real time. *Lancet* **2006** ;368(9531):258.
- 9--Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguierry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis.* **2007** ; 7: 319–327.
- 10- Staikowsky F, Talarmin F, Grivard P, Souab A, Schuffenecker I, Le Roux K, Lecuit M, Michault A. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion

- during the 2005-2006 outbreak,” PLoS ONE. **2009** ; 4, no. 10, Article ID e7603.
- 11- Jansen KA, The 2005–2007 Chikungunya epidemic in reunion: ambiguous etiologies, memories, and meaning- making,” *Medical Anthropology*. 2013 ; 32, 174–189.
- 12- Lenglet Y, Barau G, Robillard PY, Randrianaivo H, Michault A, et al. [Chikungunya infection in pregnancy: Evidence for intrauterine infection in pregnant women and vertical transmission in the parturient. Survey of the Reunion Island outbreak]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. **2006** ; 35:578–583
- 13- Jaffar-Bandjee MC, Ramful D, Gauzere BA, Hoarau JJ, Krejbich-Trotot P, Robin S, Ribera A, Selambarom J, Gasque P. Emergence and clinical insights into the pathology of Chikungunya virus infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2010** ; 8, 987–996 .
- 14- Lemant J, Boisson V, Winer A, Thibault L, André H, Tixier F, Lemerrier M, Antok E, Cresta MP, Grivard P, Besnard M, Rollet O, Favier F, Huerre M, Campinos JL, Michault A. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006. *Crit. Care Med.* **2008**; 36: 2536–2541.
- 15- Solanki BS, Arya SC, and Maheshwari P. Chikungunya disease with nephritic presentation. *Int. J. Clin. Pract.* **2007**; 61: 1941.
- 16- Seymour RL, Rossi SL, Bergren NA, Plante KS, Weaver SC. The Role of Innate versus adaptive immune responses in a mouse model of O’nyong-nyong virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* **2013** ; 88, no. 6 ,1170-79.
- 17- Kiwanuka N, Sanders EJ , Rwaguma EB, et al., O’nyong-nyong fever in south-central Uganda, 1996-1997: clinical features and validation of a clinical case definition for surveillance purposes. *Clinical Infectious Diseases*, 1999 ; 29, 1243-50.
- 18- Posey DL, O’rourke T, Roehrig JT, Lanciotti RS, Weinberg M, Maloney S. O’nyong-nyong fever in West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005** ; 73, 32 .
- 19- Labadie K, Larcher T, Joubert C et al., Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. - *J Clin Invest.* **2010** ; 120, 894–906.
- 20- Schilte C, Couderc T, Chretien F, et al., Type I IFN controls Chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells, *J Exp Med.* **2010**;207:429-42.
- 21- Bréhin AC, Casadémont I, Frenkiel MP, Julier C, Sakuntabhai A, Desprès P. The large form of human 2',5'-Oligoadenylate Synthetase (OAS3) exerts antiviral effect against Chikungunya virus. *Virology*, 2009 ; 384, 216–222.
22. Fros JJ<sup>1</sup>, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, Schnettler E, Vlak JM, Suhrbier A, Khromykh AA, Pijlman GP. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol.* 2010 Oct;84(20):10877-87. doi: 10.1128/JVI.00949-10. Epub 2010 Aug 4.
- 23- Fros JJ, van der Maten E, Vlak JM, Pijlman GP. The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling. *J Virol.* **2013**; 87:10394-400.
- 24- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, **2003** ; 63, 1256-1272.
- 25- Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry.* 1990 ; 29:11123-33.
- 26- Murphy PM. The N-formyl peptide chemotactic receptors. In: Horuk R, editor. Chemoattractant ligands and their receptors. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996:269–99.
- 27- Le Y, Oppenheim JJ, Wang JM. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors, Cytokine and Growth Factor Reviews. **2001** ; 12, 91–105.
- 28- Fu H, Karlsson J, Bylund J, Movitz C, Karlsson A, Dahlgren C. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *J Leukoc Biol.* **2006**; 79:247-256.

- 29- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* **2004**;16: 42-47.
- 30- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev.* **2004**; 52:253–265.
- 31- Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood.* **1995**; 86:1649-1660.
- 32- De Leo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol.* **1996**; 60:677-691.
- 33- Paruch S, El-Benna J, Djerdjouri B, Marullo S, Perianin A. A role of p44/42 mitogen-activated protein kinases in formyl-peptide receptor-mediated phospholipase D activity and oxidant production. *Faseb J.* **2006**; 20:142-144.
- 34- Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. A specific **p47<sup>phox</sup>**-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2006 ; 116: 2033-43.
- 35- Patel S, Djerdjouri B., Raoul-Des-Essarts R. Dang PMC, El-Benna J and Périanin A. Protein Kinase B (AKT) Mediates Phospholipase D Activation via ERK1/2 and Promotes Respiratory Burst Parameters in Formylpeptide-stimulated Neutrophil-like HL-60 Cells. *J . Biol. Chem,* **2010** ; 285, 42, 32055-63.
- 36- Rolas L, Makhezer M, Hadjoudj, S, El-Benna J, Djerdjouri, B., Elkrief L, Moreau R. and Périanin A. Inhibition of mammalian target of rapamycin aggravates the respiratory burst defect of neutrophils from decompensated cirrhotic patients. *Hepatology.* **2013** ;57:1163-71.
- 37- Bréhin AC, Rubrecht L, Navarro-Sanchez ME, Maréchal V, Frenkiel MP, Lapalud P, Laune D, Sall AA, Desprès P. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology.* **2008** ; 371, 185–195
- 38- Kuhn RJ. 2007. *Togaviridae:theviruses and their replication*,p.1001–1022. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
- 39-- Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H.A Novel Superoxide-producing NAD(P)H Oxidase in Kidney. *J. Biol. Chem.* **2001** ; 276:1417-1423.
- 40-Bedard K, Krause KH. NOX4 review: The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: *Physiol Rev.* 2007; 87(1):245-313.
- 41- Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Sol-Foulon N, Le Roux K, Prevost MC, Fsihi H, Frenkiel MP, Blanchet F, Afonso PV, Ceccaldi PE, Ozden S, Gessain A, Schuffenecker I, Verhasselt B, Zamborlini A, Saïb A, Rey FA, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P, Michault A, Albert ML, Schwartz O. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* 2007 Jun;3(6):e89.
- 42 Allanore Y<sup>1</sup>, Borderie D, Périanin A, Lemaréchal H, Ekindjian OG, Kahan A. Nifedipine protects against overproduction of superoxide anion by monocytes from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R93-100. Epub 2004 Nov 16.
43. Higashijima T, Uzu S, Nakajima T, Ross EM. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem.* 1988 May 15;263(14):6491-4.
- 44- Perianin A, Snyderman R. Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol trisphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1989 Sep 1;143(5):1669-73.
- 45-Perianin A1, Snyderman R. Analysis of calcium homeostasis in activated human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for two distinct mechanisms for lowering cytosolic calcium. *J Biol Chem.* 1989; 264:1005-9.
- 46- Yamauchi J, Kawano T, Nagao M, Kaziyo Y, Itoh H. G(i)-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase in human embryonal kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:7633-40
- 47- Gutkind JS Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE.* 2000 Jul 11; 2000(40):re1. Review.
- 48-- Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin JH, Tsichlis PN, Babior BM. Modulation of



p47<sup>PHOX</sup> activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 ; 100, 5130–5135.

49-- Sarbassov DD<sup>1</sup>, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.

50- Joubert PE, Werneke SW, de la Calle C, Guivel-Benhassine F, Giodini A, Peduto L, Levine B, Schwartz O, Lenschow DJ, Albert ML. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J. Exp. Med.* 2012 ; 209,1029-1047.

51- Das I, Basantray I, Mamidi P, Nayak TK, Chattopadhyay S, Chattopadhyay S. Heat Shock Protein 90 Positively Regulates Chikungunya Virus Replication by Stabilizing Viral Non-Structural Protein nsP2 during Infection. *PLoS One*. 2014; 9(6):e100531. doi: 10.1371/journal.pone.0100531. eCollection 2014.

52- Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, Lennon-Duménil AM, Seabra MC, Raposo G, Amigorena S. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2006 ;126, 205-18

53- Pelletier S, Duhamel F, Coulombe P, Popoff MR, Meloche S. Rho Family GTPases Are Required for Activation of Jak/STAT Signaling by G Protein-Coupled Receptors. *Mol Cell Biol*. 2003; 23:1316-33.

54- Wu EH, Lo RK, Wong YH. Regulation of STAT3 activity by G16-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 303 :920-5.

55- Cattaneo F, Iaccio A, Guerra G, Montagnani S, Ammendola R. NADPH-oxidase-dependent reactive oxygen species mediate EGFR transactivation by FPRL1 in WKYMVm-stimulated human lung cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51:1126-36.

56- Zhou Y, Bian X, Le Y, Gong W, Hu J, Zhang X, Wang L, Iribarren P, Salcedo R, Howard OM, Farrar W, Wang JM. - Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97:823-35.

## Figure legends

**Figure 1.** ONNV inhibited the proliferation of HEK-fPR cells with a moderate alteration of fPR expression. Cells were seeded at the density of  $3 \times 10^6$  cells per 100 mm-plate in 10 ml DMEM, and infected at MOI 0.1 and 0.4 for 40 H. Data represent the number of cells per plate before and after infection (n=5, \*: P <0.05). Panel B and C indicate the expression of fPR-YFP analyzed by FACS. The mean fluorescence intensity (MIF) was expressed as percentage of control (Panel B, n=4, \*: P <0.05).

**Figure 2.** ONNV block the activation of AKT/MAP kinases signaling pathway induced by fMLP but not PMA in HEK-fPR cells. Cells were cultured in the absence (control) or presence of ONNV at MOI 0.1 for 40 H. Cells were collected and treated in suspension in the presence of 1  $\mu$ M fMLP for 1 and 3 min (F1', F3') or with 100 nM PMA for 5 min. A representative western-blot of phospho-AKT (P-pAKT), phospho-p-38 MAPK, and phospho-ERK is shown in Panel A. The intensity of phosphorylation of effectors was quantified (Panel B-D) and expressed as percentage of the maximal response of control cells induced by 1  $\mu$ M fMLP for 3 min (F3'). The phosphorylation of effectors induced by 100 nM PMA for 5 min (Panel E) was expressed as percentage of control values (n=4 separate experiments, \*, P<0.05).

**Figure 3.** ONNV impaired ROS production by HEK-fPR cells. HEK-fPR cells cultured in the absence (control) or presence of ONNV at MOI 0.1 for 40 H were collected and the production of ROS was assessed by chemiluminescence induced by  $\mu$ M fMLP or 100 nM PMA. Results represent the peak of chemiluminescence response and are expressed as percentage of control values (mean of 4 experiments, \*P<0.05)

**Figure 4.** Infection of human monocytes with ONNV inhibited the activation of AKT/MAP kinases signaling pathway induced by fMLP and PMA. Monocytes were cultured in the absence (control) or presence of ONNV at MOI 0.1 and 0.4 for 40 H. Adherent cells were harvested with PBS containing 5 mM EDTA, washed and suspended in HBSS for stimulation with 1  $\mu$ M fMLP for 0.5-3 min or with 100 nM PMA for 5 min. A representative western-blot of phospho-AKT (P-pAKT), phospho-p-38 MAPK, and phospho-ERK is shown in Panel A. The intensity of effector phosphorylation induced by fMLP was quantified (Panel B-D) and expressed as percentage of maximal control response induced by 1  $\mu$ M fMLP (Panel A-D and G, n=3-4 experiments). The phosphorylation of effectors induced by 100 nM PMA for 5 min (Panel F and H) was expressed as percentage of control values (n=3 separate experiments, \*, P<0.05). The expression of viral proteins (pE2, E2) was detected by western blot using a mouse antiserum against ChikV proteins (Panel E).

**Figure 5.** ONNV impaired ROS production by human monocytes. Cells cultured in the absence (control) or presence of ONNV at MOI 0.4 for 40 H were collected and the production of ROS was assessed by chemiluminescence induced by  $\mu$ M fMLP (Panel A) or 100 nM PMA (Panel B), 100nM C5a or 15 $\mu$ M Mastoparan. Results represent the peak of chemiluminescence response, expressed as percentage of control values (mean of 4 experiments, \*P<0.05)

**Figure 6:** Proposed model for the inhibition of fPR- and PMA-mediated ROS production by ONNV. Stimulation of HEK cells via the G-protein coupled receptor fPR triggers a rapid activation of AKT, p38-MAPK, p44/42-MAPK (ERK1/2) and production of ROS by NADPH oxidase. Infection of cells by ONNV inhibited the activation of the three protein kinases induced by via fPR stimulation but not by PMA in HEK cells. ONNV also inhibited PMA-induced ROS production, which suggests two

distinct signaling steps of viral interference; at the fPR/G protein complex and NADPH oxidase complex.

Figure 1

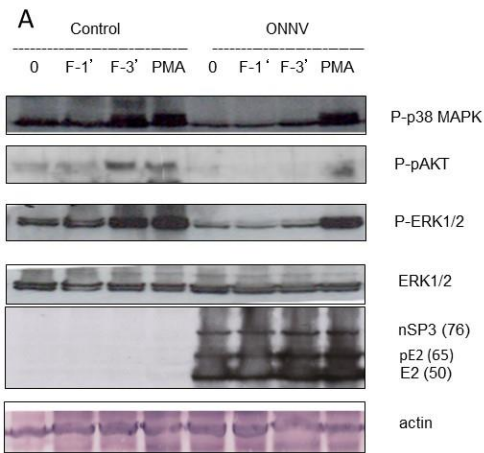
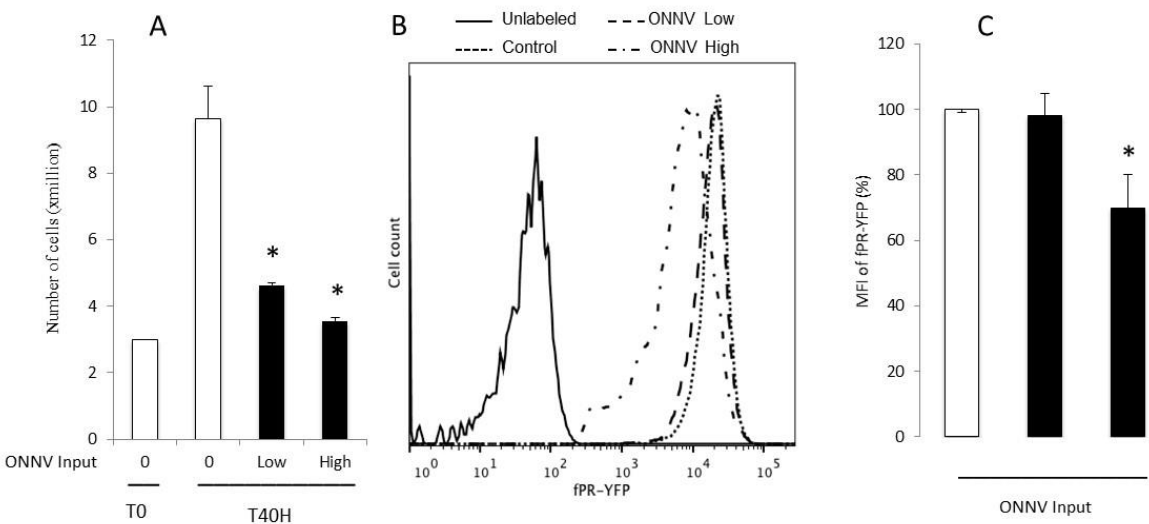


Figure 2

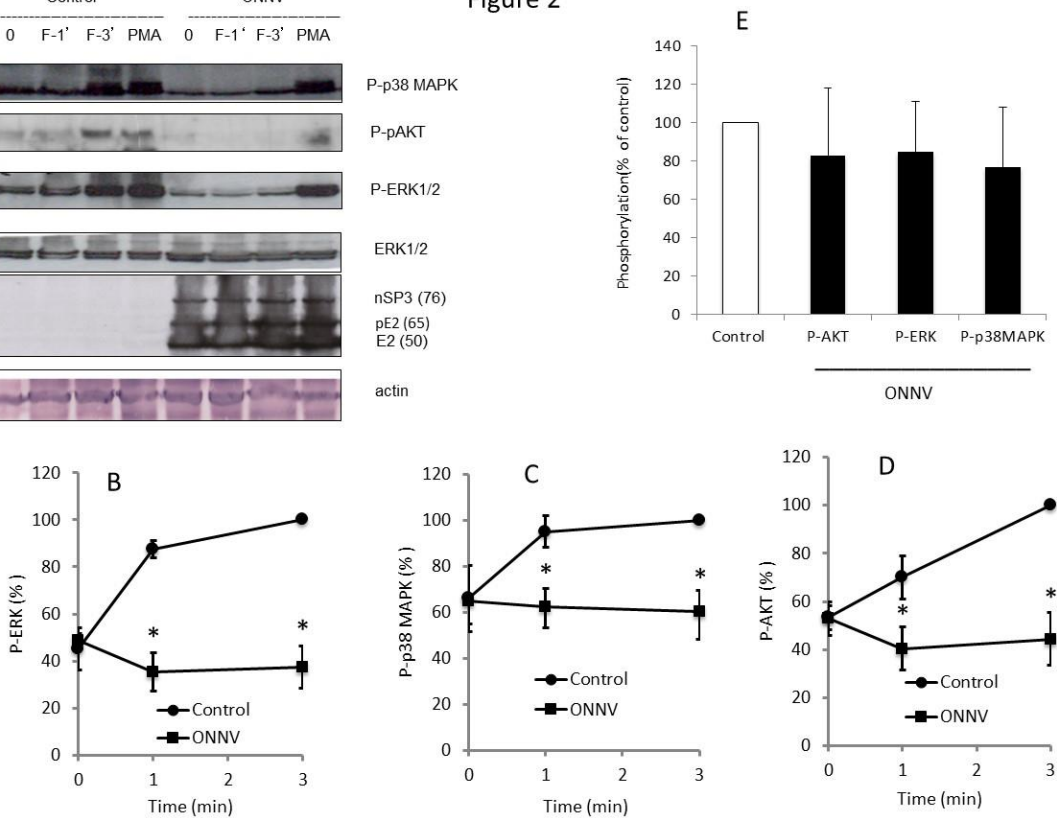


Figure 3

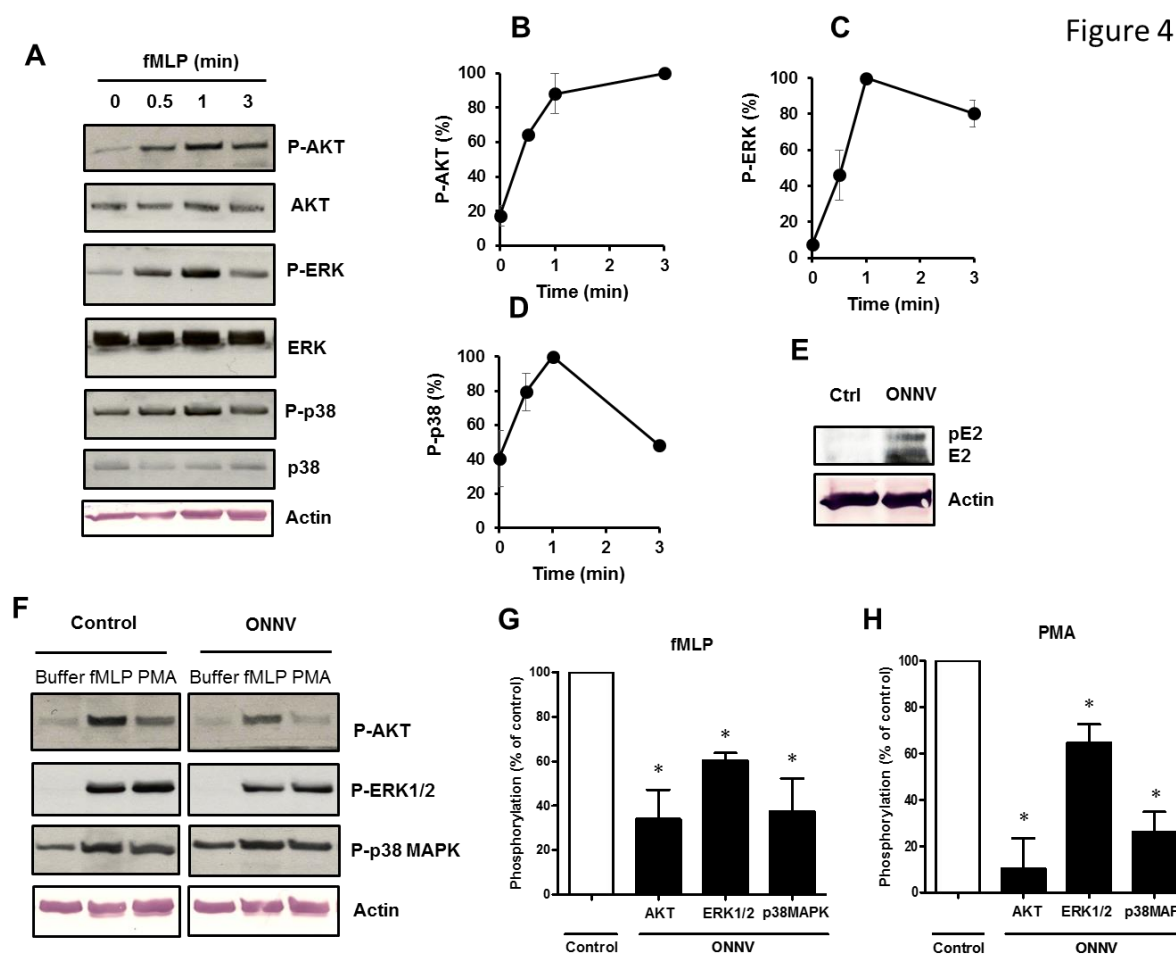
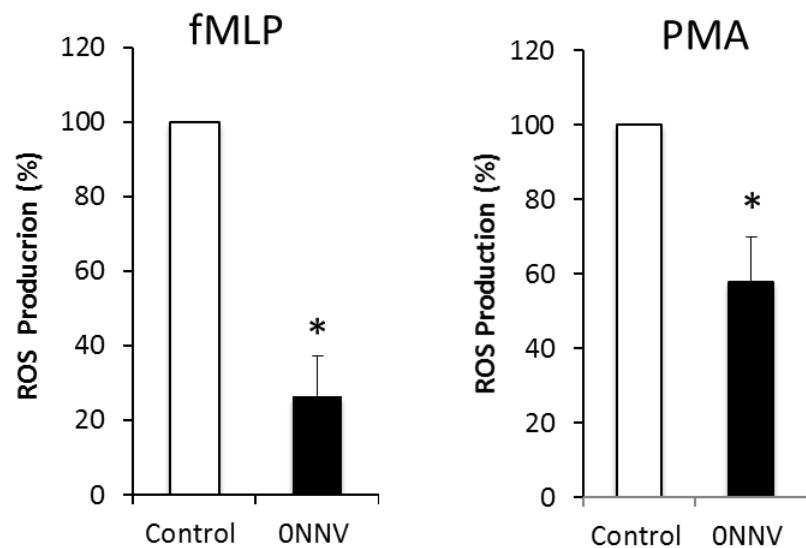


Figure 5

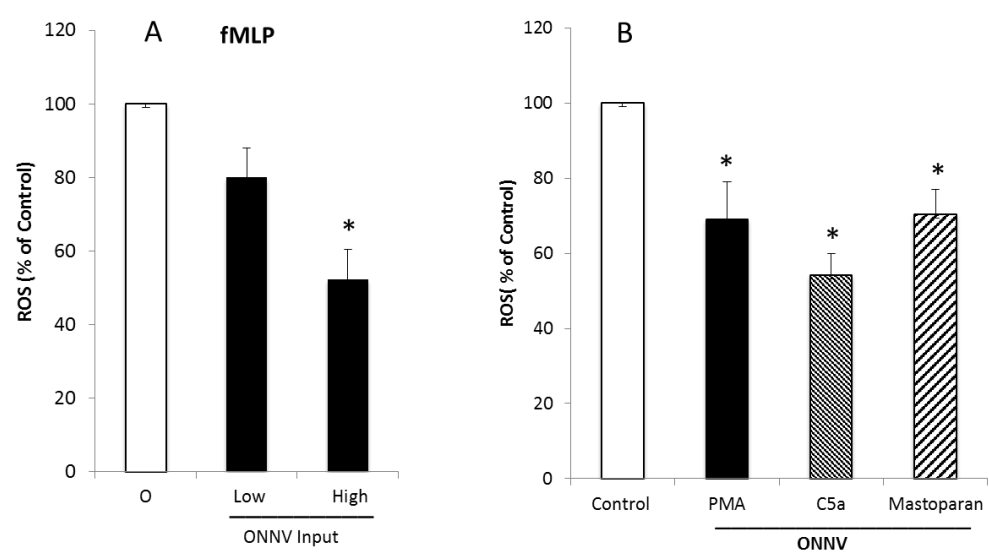
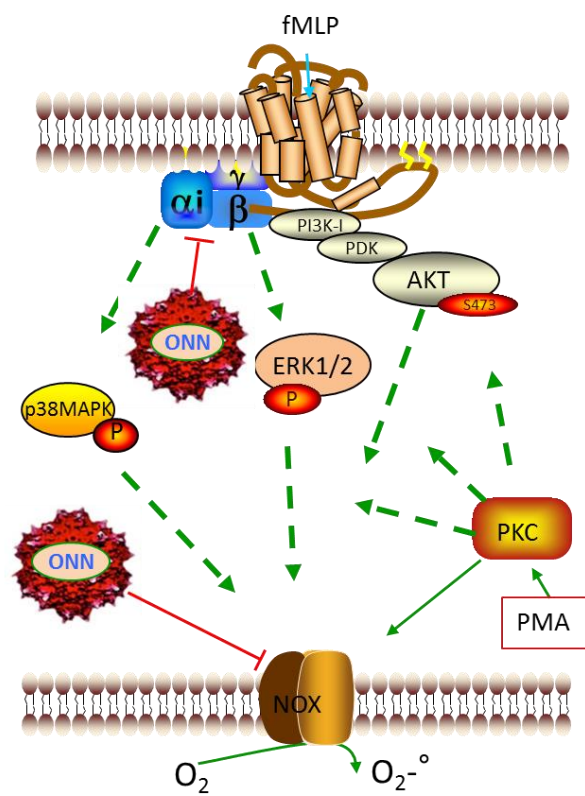
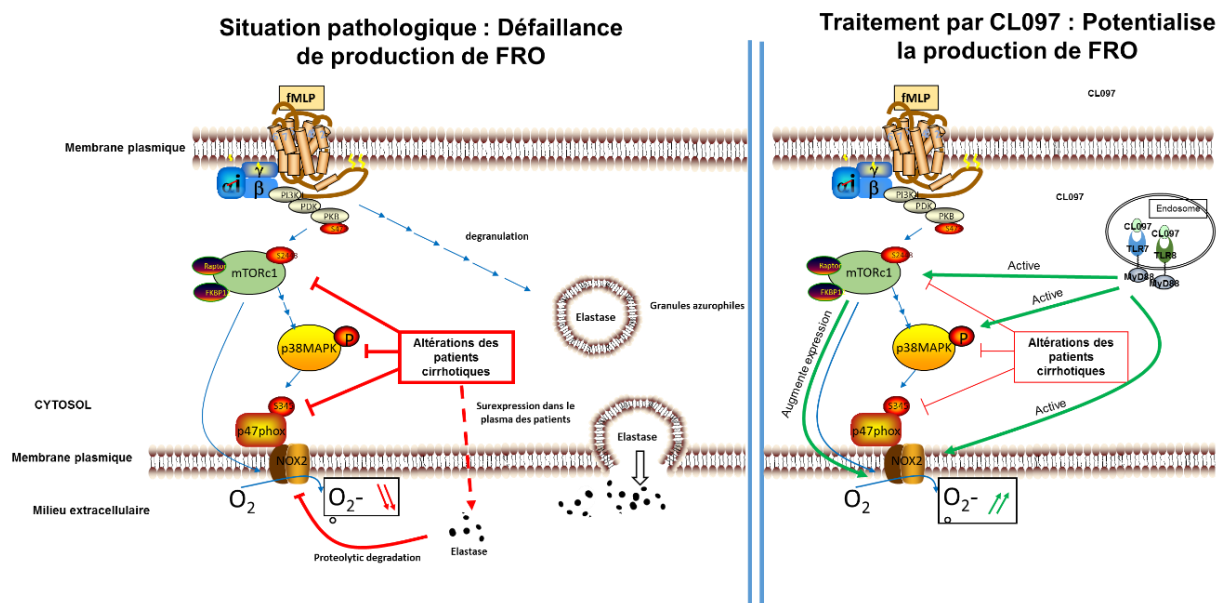


Figure 6



### 3 - Discussion générale

Durant cette thèse, j'ai étudié deux niveaux de régulation majeure de la réponse anti-infectieuse des neutrophiles humains, la signalisation qui contrôle la production de FRO via la NOX2 des neutrophiles sains induit par le récepteur de peptides formylés (fPR), et l'expression des composants du complexe NADPH Oxydase NOX2 dans des conditions physiopathologiques. Mes résultats montrent une contribution majeure de la protéine kinase mTOR dans la production d'anion superoxyde du neutrophile induite par le fMLP. La protéine kinase mTOR agit en amont de la p38-MAPK qui phosphoryle la sérine 345 de la p47<sup>phox</sup>. En outre, une dégradation protéolytique « soutenue » de la gp91<sup>phox</sup> (NOX2) induite par le fMLP a été observée dans les neutrophiles impliquant l'élastase libérée à partir des granules primaires. Des travaux ont été également menés avec des neutrophiles de patients cirrhotiques en vue de valoriser les nouvelles fonctions de mTOR et tenter de comprendre la grande susceptibilité de ces patients aux infections microbiennes. Une forte défaillance de production d'anion superoxyde induite par le fMLP a été observée, et qui était aggravée par le traitement de ces neutrophiles par la Rapamycine, un inhibiteur de mTORC1. De plus, une expression défaillante de la gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et mTOR des neutrophiles de patients a également été observée. L'élastase s'est révélée être une des candidates vraisemblables pour expliquer ces déficiences. **Ces conclusions originales permettent de proposer un nouveau modèle de régulation de la NADPH oxydase d'une part via la protéine kinase mTOR et d'autre part par la protéase élastase. Ces résultats suggèrent la possibilité de retombées cliniques du fait des antagonistes de ces deux enzymes qui sont utilisés comme médicaments.**



### **3.1.1 L'importance fonctionnelle de mTOR dans l'explosion oxydative des PN normaux**

Notre étude apporte ainsi de nouveaux éléments sur la manière dont les voies de signalisation du fPR régulent l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles humains. La protéine kinase mTOR émerge comme un acteur important de cette régulation. En effet, la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> des neutrophiles induite par le fMLP a été inhibée de 40% suite au blocage pharmacologique de l'activité de mTORC1 par la Rapamycine (fig. 2 c et d, article 1). Cette contribution de mTOR a été confirmée par l'inhibition de l'expression de mTOR par des oligonucléotides antisense (100 nM) dans les cellules HL-60 différenciées en neutrophile. Une inhibition de 50% de la production d'anion superoxyde a été observée alors que la déplétion de mTOR n'était que d'environ 50% (Fig. 5 a, b et c, article 1). Ceci suggère que la contribution de mTOR dans l'activation de la NOX2 serait en réalité beaucoup plus importante. Malheureusement, une plus forte concentration d'antisense (200 nM) n'a pas permis de dépléter mTOR davantage probablement en raison d'un stock de mTOR déjà présente au début du traitement des cellules. Une déplétion partielle de mTOR a donc réduit plus efficacement la production d'anion superoxyde que le blocage total de l'activité de mTORC1 par la Rapamycine. Cela peut s'expliquer par le fait que la Rapamycine ne cible que mTORC1 alors que la déplétion mTOR, réduit à la fois mTORC1 et mTORC2. D'autres équipes ont pu mettre en évidence dans des lignées MEF que la phosphorylation de 4EBP1, un des substrats de mTORC1, est plus fortement inhibée en utilisant un inhibiteur ciblant mTORC1 et mTORC2 tel que la Torine 2, qu'en utilisant la Rapamycine (Thoren CC et al, 2009). Il pourrait alors être envisageable que l'inhibition simultanée de mTORC1 et mTORC2 réduise plus fortement la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> des neutrophiles stimulés par le fMLP que l'usage de la Rapamycine seule. Nos résultats préliminaires (Figure Annexe 1, C) confirment en effet que l'inhibition conjointe de mTORC1 et mTORC2 par PP242 qui inhibe de 80% la production d'anion superoxyde des PN stimulés par le fMLP par rapport aux 50% de la Rapamycine seule.

Les résultats ont également montré que 20% des donneurs testés n'étaient pas sensibles à la Rapamycine. Cela pourrait venir du niveau d'expression de mTORC1 dans les neutrophiles de ces donneurs mais également du niveau de production basale de FRO. En effet, les résultats nous ont permis de constater qu'il existait de fortes variations d'expression de mTOR entre les différents donneurs (Fig 9 article 2). Chez ceux qui possèdent une expression réduite de mTOR, la kinase pourrait avoir une contribution réduite dans l'explosion oxydative. D'autres équipes ont pu montrer que la Rapamycine était inactivée par les FRO (Neklesa TK, PNAS 2008). Or, la production des FRO par les neutrophiles soit à l'état basal, soit induite par le fMLP peut là



aussi être variable entre les donneurs et pourrait alors expliquer pourquoi certains semblent moins sensibles à la Rapamycine. Les résultats indiquent, par ailleurs, que les effets inhibiteurs observés chez certains donneurs ne proviennent pas d'effets cytotoxiques. En accord avec cette hypothèse, la rapamycine (1 à 20 nM) n'a pas d'effet sur la production d'anion superoxyde induite par un activateur direct des PKC, le PMA (résultats non montrés), de même que le PP242 (Figure annexe 1C).

### 3.1.2 Mécanismes d'action de mTOR :

Le mécanisme par lequel mTOR contrôle la production d' $O_2^{\cdot -}$  a été étudié par différentes approches complémentaires. Au niveau physiologique, en comparant les paramètres cinétiques de l'explosion oxydative et au niveau transductionnel en analysant la phosphorylation et la localisation subcellulaire d'effecteurs clés de l'explosion oxydative (MAPK,  $p47^{phox}$ ). La mesure en temps réel de la production d'anion superoxyde quantifiée par la technique de réduction du cytochrome C apporte des informations sur la vitesse initiale contrairement aux autres techniques courantes comme la cytométrie en flux. Les résultats ont ainsi montré que la rapamycine réduit la vitesse initiale de production d' $O_2^{\cdot -}$  (Figure annexe 2, A). Cela indique que mTORC1 régule les mécanismes qui régissent l'activation de la NADPH oxydase, tels que la cascade de phosphorylation enclenchée suite à l'activation du fPR et /ou l'assemblage du complexe à la membrane. Parmi les nombreux effecteurs de la signalisation mobilisés dans les neutrophiles stimulés par le fMLP, les PKC ne semblent pas être inhibées par la Rapamycine car elle n'a pas modifié la production d' $O_2^{\cdot -}$  induite par le PMA activateur direct des PKC (Résultats non montrés). En revanche, la Rapamycine inhibe la phosphorylation d'un site MAPK, la S345 de la  $p47^{phox}$  (Fig 3A, B, C article 1) induite par le fMLP. Parmi les trois familles majeures de MAPK, deux sont principalement impliquées dans la production d'anion superoxyde, la p38-MAPK et ERK1/2. Les résultats indiquent cependant que c'est la p38-MAPK qui est préférentiellement activée en aval de mTOR. Ceci repose sur le fait que les valeurs d' $IC_{50}$  d'inhibition par la Rapamycine sont identiques pour l'inhibition des phosphorylations de  $p47^{phox}$  S345 (3-5 nmol/L) et p38-MAPK (3-5 nmol/L) et de la production d' $O_2^{\cdot -}$  (Figure Annexe 2, B). En revanche, concernant la phosphorylation de ERK1/2, cette  $IC_{50}$  était bien plus élevée (20 nmol/L), indiquant un rôle mineur de ERK dans la voie de mTOR. Cependant, les mécanismes par lesquels mTOR active les MAPK ne sont pas connus et restent donc à élucider. Nos résultats préliminaires d'immuno-précipitation montrent que mTOR se retrouve dans un complexe avec p38-MAPK dans les PN stimulés par fMLP (Figure annexe 3, A). MTOR peut ainsi activer directement ou indirectement soit le module RAF1/MEK3/6/p38-

MAPK ou directement les p38-MAPK du PN. Quelque soit le mécanisme (voir ci-après), cette étude démontre ainsi l'existence d'une nouvelle voie de signalisation mTORC1/p38-MAPK/p47<sup>phox</sup>S345 qui est mobilisée par le fMLP pour activer la NOX2. Cette voie a été également confirmée dans le modèle de déplétion de mTOR dans les lignées HL60 différenciées.

Cependant, il nous a semblé nécessaire de vérifier l'importance physiologique du nouvel axe de signalisation AKT/mTORC1/p38-MAPK/p47<sup>phox</sup>/NOX2, qui nous semble émergent dans les PN normaux stimulés par le fMLP. Ainsi, la surexpression d'AKT dans des lignées HEK-293T exprimant stablement le fPR a en effet potentialisé les phosphorylations de mTOR (S2448) et p38-MAPK (Figure annexe 3, B et C) tandis que l'inhibition pharmacologique d'AKT dans des neutrophiles stimulés par fMLP a eu l'effet inverse en réduisant les phosphorylation de mTORC1 et p38-MAPK induites par le fMLP (Figure annexe 3, D et E). Quelques données bibliographiques attestent de l'existence de ce couplage. Ainsi, l'activation de mTORC1 par AKT est documentée selon 3 mécanismes : Une phosphorylation directe de la kinase mTOR *in vitro* (Sekulic A et al, 2000), via l'inhibition de l'hétérodimère TSC1/TSC2 (Inoki K et al, 2002) ou encore via l'induction de la dégradation du répresseur de mTORC1, PRAS40 (Wiza C et al, 2012). Quant au couplage transductionnel mTOR/p38-MAPK, il est démontré dans notre étude (Article 1) indiquant que la Rapamycine inhibe la phosphorylation de p38-MAPK induite par le fMLP (Rolas L et al, 2013). D'autres travaux montrent que mTORC1 se retrouve en amont de la p38-MAPK car son inhibition a été observée lors de l'usage de la Rapamycine afin de prévenir la resténose lors de la pose d'un stent au niveau d'artères (Omura T et al, 2005). Le substrat direct de mTOR, la kinase S6K1 pourrait participer en retour à l'activation du module MAPK, comme le suggèrent les résultats d'une analyse *in silico* (Figure annexe 2A). Enfin, la voie p38-MAPK/p47<sup>phox</sup> est démontrée *in vitro* par le fait p38-MAPK phosphoryle directement la sérine 345 de la p47<sup>phox</sup> (El Benna J et al, 1996), que dans les PN, l'inhibiteur de la p38-MAPK inhibe la phosphorylation de la p47<sup>phox</sup> (Dang PM et al, 2006). Enfin, dans les PN stimulés par fMLP, la Rapamycine inhibe la phosphorylation de la p38-MAPK et p47<sup>phox</sup>(S345) avec la même valeur d'IC<sub>50</sub> (3-5 nM), ce qui est faveur de l'axe mTOR/p38MAP/p47<sup>phox</sup>.

D'autres groupes utilisant des lignées cancéreuses montrent au contraire que l'inhibition de mTOR par la Rapamycine conduit à l'augmentation de la phosphorylation des MAPK (Carracedo A, JCI 2008). Nous avons également observé qu'en absence de stimulation des PN, la Rapamycine (Fig. 3 Article 1) et la déplétion de mTOR (Fig.5E Article 1) entraînent l'augmentation de la phosphorylation basale de la p47<sup>phox</sup>(S345) et de p38-MAPK. Plusieurs

explications peuvent être proposées : Le mode d'activation de mTOR pourrait conditionner la manière dont elle régule la signalisation en aval, notamment si elle se retrouve à la membrane plasmique suite à la stimulation des neutrophiles par le fMLP ou au niveau de la membrane lysosomale. Une inhibition des phosphatases peut également être envisagée puisqu'il a été montré que mTOR pouvait également inhiber la phosphatase PP2A dans des cellules cancéreuses (Hui L et al, 2005), or l'activation du module MAPK peut être régulée par la phosphatase PP2A dans les neutrophiles humains. En absence d'activation des neutrophiles, la levée de l'inhibition des phosphatases via la Rapamycine pourrait entraîner la phosphorylation des MAPK.

Afin de comprendre par quel mécanisme mTOR pourrait induire la phosphorylation de p38-MAPK une analyse in-silico basée sur la connaissance du motif consensus de phosphorylation de mTOR (WY/x/x/AP/GP/phosphorylation/FPLWYV/H (Hsu PP, Science 2011)) a été réalisée (figure annexe 2, A). Elle révèle que mTORC1 n'est pas un candidat pour la phosphorylation directe de la Thr-180 de la p38-MAPK ou de la Thr-202 de ERK1/2, sites activateurs de ces MAPK, mais qu'à l'inverse l'un de ses substrats connus, S6K1, serait capable de phosphoryler Raf-1 sur les sites activateurs Ser-259 ou Ser-338 qui conduisent à l'activation de ERK et pourrait également phosphoryler ASK1 (aussi appelé MAP3K5) sur les sites activateurs Ser-83 ou Ser-966 afin d'entraîner l'activation de la p38-MAPK. Ces nouveaux éléments permettent donc de renforcer nos résultats d'autant que dans le neutrophile, la voie S6K est activée par l'acide phosphatidique généré par la PLD2 (Frondorf K et al, 2010) qui, elle-même, est fortement activée par le fMLP (Paruch S et al, 2006). Par ailleurs, cette approche informatique permet également de supposer que mTORC1 pourrait directement phosphoryler certains composants du complexe NADPH oxydase sur des sites importants pour leur activation : la p47<sup>phox</sup> sur les Ser-345 et Ser-359 (Boussetta T, Blood 2010 ; Johnson JL, JBC 1998), la Ser-337 de la p40<sup>phox</sup> qui participerait à sa liaison à la p67<sup>phox</sup> (Wilson MI, MC 2003), la p22<sup>phox</sup> au niveau de la Thr-132 et enfin au niveau de la Thr-108 de Rac2 un site non identifié sur la protéine mais déjà identifié sur Rac1 (Tong J, MCB 2013). Ces hypothèses contribueraient à donner à mTORC1 un rôle encore plus large dans l'activation du complexe NADPH oxydase en plus de sa capacité d'induire l'activation des MAPK que nous avons évoqué ci-dessus.

### 3.1.3 L'assemblage du complexe NADPH oxydase à la membrane est indépendante de mTOR

L'assemblage du complexe NADPH oxydase à la membrane est une étape essentielle de l'explosion oxydative dans les neutrophiles. Afin d'examiner si mTOR pouvait réguler cet assemblage de la NADPH oxydase, nous avons testé les effets de la Rapamycine sur des cellules stimulées ou non par le fMLP. Les résultats montrent que mTORC1 ne contrôlerait pas l'assemblage du complexe NADPH oxydase (Figure 4, article 1). Cependant, le fait que la production de FRO induite par fMLP soit inhibée par la Rapamycine, au contraire de la translocation des éléments cytosoliques du complexe, suggère que cette étape de translocation à la membrane n'est pas indispensable pour l'activation de la NADPH oxydase sous fMLP. Des travaux précurseurs de Dusi et collaborateurs sont en faveur de ce découplage puisqu'ils montrent que l'inhibition des sérines/thréonines kinases par la staurosporine n'affecte pas la translocation à la membrane plasmique de  $p47^{phox}/p67^{phox}$  induite par le fMLP malgré l'inhibition de la production de FRO induite par le fMLP (Dusi S, Biochem J 1993). L'association de la p38-MAPK à la membrane n'est pas une chose de bien documentée. Elle est connue pour être cytosolique et capable de transloquer dans le noyau. Cette présence de p38-MAPK à la membrane soulève la possibilité que la p38-MAPK puisse phosphoryler la  $p47^{phox}$  cytosolique mais également membranaire.

### 3.1.4 mTOR régule l'expression de la $gp91^{phox}$ du PN

Une expression adéquate des composants de la NADPH oxydase est nécessaire pour réguler une production de FRO suffisamment forte pour que les neutrophiles puissent éliminer les bactéries. Cependant, la contribution de mTOR dans l'expression des éléments de la NADPH oxydase n'avait jamais été étudiée jusque-là. Nos résultats ont montré une nouvelle propriété de mTOR. En effet, le traitement des neutrophiles avec la Rapamycine pendant 1 heure a réduit l'expression basale de la NOX2 (Fig.9 article 2), indiquant que l'expression de la NOX2 serait constitutive et régulée par mTORC1. Nous n'avons néanmoins pas effectué de cinétique de traitement avec la Rapamycine afin d'examiner si cette inhibition d'expression de NOX2 pouvait être compatible avec l'inhibition de la production d' $O_2^-$  de neutrophiles prétraités par la Rapamycine pendant 20 min. Cependant, des travaux réalisés dans des lignées hépatiques H4IIE ont montré une synthèse rapide de nouvelles protéines dépendante de mTOR, après 1h de stimulation des cellules par les hormones de croissance et qui était bloquée par la Rapamycine (Hayashi AA et Proud CG et al, 2007). L'inhibition de l'expression de la NOX2 induite par la rapamycine peut également impliquer d'autres mécanismes notamment des

protéases puisque nos résultats de la 2ème partie montrent que la NOX2 peut subir une dégradation protéolytique dans les neutrophiles (Fig. 3 manuscrit 2). Cette hypothèse peut résulter de l'activation de l'autophagie consécutive à l'inhibition de mTOR par la Rapamycine (Hosokawa T et al, 2009).

### **3.1.5 La contribution de mTORC1 dans l'activité antibactérienne du PN**

Le fait que mTOR régule la production de FRO des neutrophiles stimulés par le fMLP suggère qu'elle contribue également aux fonctions antibactériennes des neutrophiles. Afin de vérifier cela, l'effet de la Rapamycine a été examiné sur la phagocytose d'E.Coli par les PN d'une part, et leur activité antibactérienne, d'autre part. Les résultats ont alors montré que mTORC1 ne contrôle pas les processus d'englobement des bactéries mais contrôle bien l'activité antibactérienne du neutrophile induite par le fMLP (Fig.6 Article 1). Ce modèle de bactéricidie induit par le fMLP est fortement dépendant des FRO puisque la stimulation des neutrophiles en suspension par le fMLP génère une faible dégranulation (Rainger GE et al, 1998) et nécessite souvent l'utilisation de cytochalasine B pour être mesurable. Ce résultat indique alors que l'axe mTOR/p38-MAPK/p47<sup>phox</sup>/NOX2 joue un rôle central dans l'activité antibactérienne des neutrophiles. Néanmoins, les FRO ne sont pas seuls à contribuer à l'activité antibactérienne des PN ; les formes réactives dérivées de l'azote, la NETose et les protéases dégranulées y participent activement. Or, une déficience de l'activité MPO a été observée chez les PN de patients cirrhotiques (Garfia C, J Hepatol 2004) en accord avec les travaux en cours dans le laboratoire par Boussif A. et collaborateurs (manuscrit, soumis, résultats annexes). Il serait donc intéressant d'étudier si mTOR contrôle également les mécanismes de défense antibactérienne du PN indépendants de l'oxygène.

L'ensemble de nos résultats obtenus dans cette première partie avec des neutrophiles normaux suggère que les stratégies qui consistent à inhiber l'activité de mTOR chez des patients défaillants pour la production de FRO pourraient être nuisibles et entraîneraient une susceptibilité accrue aux infections bactériennes. Cependant, l'importance de mTOR dans la régulation des neutrophiles de patients immunodéprimés reste non étudiée.

### **3.1.6 Défaillance de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> des PN de patients cirrhotiques et son aggravation par la rapamycine**

Dans le but de déterminer l'importance physiopathologique de mTOR, nous avons comparé l'état d'activation de la nouvelle voie de signalisation mTOR/MAPK/p47<sup>phox</sup>/NOX2 dans les neutrophiles de patients ayant une cirrhose hépatique alcoolique avancée et dans les

neutrophiles normaux. Ces patients atteints de formes graves de cirrhose hépatique alcoolique, forme dite décompensée, sont caractérisés par un sepsis, c'est-à-dire des infections bactériennes généralisées. Leur taux de mortalité est très élevé atteignant les 70% à un an (D'Amico G et al, 2006) et le seul traitement envisageable est la transplantation d'un nouveau foie.

Nos résultats montrent une grave déficience de la production d'anion superoxyde induite par le fMLP (Fig. 1, article 1). De plus, cette défaillance est aggravée par la Rapamycine. Ces taux réduits de production d' $O_2^-$  des neutrophiles de patients traités par la Rapamycine sont du même ordre que la quantité d' $O_2^-$  produite par certains patients CGD et qui développent des infections bactériennes répétées (Bohler MC et al, 1986). Ainsi, l'utilisation de la Rapamycine chez des patients cirrhotiques pourrait donc aggraver leur susceptibilité aux infections bactériennes. De manière remarquable, la production d' $O_2^-$  des PN de patients cirrhotiques n'était plus potentialisable par la cytochalasine B, contrairement aux PN sains (Fig 1, article 1). Ceci suggère que des altérations biochimiques acquises au cours de la cirrhose hépatique alcoolique altèrent leur cytosquelette. Cela pourrait expliquer la défaillance de migration des neutrophiles des patients cirrhotiques observée par d'autres groupes (DeMeo AN et al, 1972) et de la dégranulation induite par le fMLP (Boussif Abdelali, manuscrit en annexe).

D'autres équipes ont montré une association entre la faible production d' $O_2^-$  des PN de patients cirrhotiques et l'état d'avancement de leur maladie (Garfia C, J Hepatol 2004). Cette défaillance n'était pas propre à une stimulation des PN par le fMLP mais était également présente suite à la stimulation des PN par le Zymosan,  $TNF\alpha$  et NaF (un activateur de protéines G trimériques). Ce résultat renforce notre hypothèse suggérant que ces déficits résultent préférentiellement de modifications de la signalisation intracellulaire. Une déficience au niveau de la PLC a été montrée (Garfia C, J Hepatol 2004). Plusieurs travaux montrent cependant qu'une fraction des neutrophiles de patients cirrhotiques développent une production spontanée de FRO (Mookerjee RP et al., 2007 ; Bruns T et al, 2011) dont l'intensité est corrélée à l'avancement de la pathologie (Bruns T et al, 2011). Ces travaux de Bruns et collaborateurs précisent par ailleurs que ces neutrophiles de patients cirrhotiques infectés qui produisent spontanément des FRO développent une réponse diminuée lorsqu'ils sont mis en présence d'E-Coli opsonisées. Le mécanisme de cette inhibition n'a pas été exploré. Il est possible d'envisager que les PN des patients subissent une désensibilisation de leurs voies de signalisation, lors d'une infection généralisée. Alternativement, une perte de récepteurs de surface impliqués dans les reconnaissances des bactéries ou encore une dégradation de la NOX2 ne sont pas à négliger. Dans notre cohorte de patients cirrhotiques, l'expression des récepteurs du fMLP (fPR) n'était pas modifiée (Boussif, manuscrit en annexe).

De nouvelles études chez la souris redonneraient un intérêt à la Rapamycine comme traitement pour la cirrhose hépatique. Ces études montrent en effet qu'elle entraîne un ralentissement de la progression de la cirrhose hépatique murine et une réduction de la destruction du foie (Neef M. J Hepatol, 2006 ; Wang W, PLoS One 2014). Nos résultats permettent néanmoins de soulever de nécessaires précautions sur l'usage de la Rapamycine comme moyen de lutte contre la cirrhose hépatique alcoolique décompensée puisqu'ils montrent une forte réduction de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> des neutrophiles de ces patients. Cette précaution est corroborée par plusieurs faits. Tout d'abord, des études cliniques chargées d'évaluer l'efficacité du médicament dans le cadre de transplantations de reins ou de foie et ont mis en évidence une augmentation des infections bactériennes chez les patients traités par la Rapamycine (Fisher A, Liver Transpl 2004) par rapport à d'autres patients transplantés et traités par Tacrolimus, un autre immunodépresseur utilisé afin de prévenir le rejet de greffes. Ensuite, des travaux récents montrent que la diminution des fonctions antibactériennes des neutrophiles circulant était corrélée au développement d'infections, de dysfonctionnement d'organes et compromettait la survie immédiate des patients après 90 jours à 1 an (Taylor NJ, Aliment Pharmacol Ther 2014). Il s'avère donc souhaitable de ne pas aggraver la faiblesse des fonctions de défense des PN de patients à un stade avancé de leur cirrhose hépatique mais de tenter de comprendre ces défaillances pour les corriger.

### **3.1.7 Les défaillances moléculaires de l'explosion oxydative des PN de patients cirrhotiques**

Le déficit de production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par les PN de patients cirrhotiques nous a permis d'identifier deux niveaux de défaillance moléculaire. Le premier est caractérisé par un défaut de phosphorylation d'effecteurs transductionnels internes tels que p38-MAPK, p47<sup>phox</sup> (Fig1 Article 1) et p44/42-MAPK (Boussif A et al, manuscrit 3) dans les PN stimulés par le fMLP sans altération de leur taux d'expression. Ces résultats permettent de confirmer les précédents travaux qui attribuent une contribution centrale de la p38-MAPK dans l'explosion oxydative du PN via sa capacité à phosphoryler les éléments de la NADPH oxydase tels que la p47<sup>phox</sup> et la p67<sup>phox</sup> (Dang MC et al, 2003).

Par ailleurs, des défaillances d'autres effecteurs majeurs de l'explosion oxydative, notamment les PKC, sont également envisageables. En effet, d'autres groupes ont montré un déficit de l'explosion oxydative des PN de patients cirrhotiques induite par le PMA (Szuster-Ciesielska A et al, 2002). Nos résultats (non publiés) confirment cette conclusion néanmoins certains patients n'ont pas manifesté de défaillance des PKC, en accord avec les travaux de Garfia (Garfia 2004). Ces différences pourraient s'expliquer par plusieurs facteurs notamment,

l'état d'avancement de la maladie, les conditions expérimentales utilisées pour quantifier l'explosion oxydative (concentrations de PMA trop élevées, mesure de FRO par cytométrie en flux ou par réduction du cytochrome C) ou encore les traitements médicaux que subissent les patients. Dans la mesure où le PMA active directement les PKC et que celles-ci activent directement la NADPH oxydase, ces résultats suggèrent que les défaillances induites par la cirrhose alcoolique pourraient altérer directement les PKC et/ou les composants de l'oxydase, ce qui a motivé notre intérêt pour cette 2ème partie de ma thèse.

Le 2<sup>ème</sup> type d'altération est caractérisé par un déficit d'expression de la gp91<sup>phox</sup>, de la p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> ainsi que la protéine mTOR (Fig.1 et 9, manuscrit 2). Cependant, il est difficile de se prononcer sur l'importance de ces déficits d'expression par rapport aux défaillances des voies de signalisation qui contrôlent le complexe. Afin de comprendre davantage les origines possibles de ce déficit d'expression des PN des patients, la quantité d'ARN messager présent a été quantifiée afin de déterminer si une synthèse réduite de ces protéines pouvait expliquer leur déficit respectif d'expression. Néanmoins, comme aucune différence n'a été observée par rapport aux PN sains (Figure 1E, manuscrit 2), cela nous a permis de suggérer que l'activité transcriptionnelle des neutrophiles de patients cirrhotiques n'était pas réduite au cours de la pathologie.

La dégradation de protéines est un des mécanismes d'inhibition des neutrophiles. Il est bien établi, par exemple, qu'une fois stimulés, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont internalisés et dégradés, rendant les cellules réfractaires ou moins réactives à de nouvelles stimulations. Les récepteurs aux chimiokines CXCR1 et CXCR2 des neutrophiles qui lient l'IL8 sont dégradés par les métalloprotéinases, et ce mécanisme réduit la capacité qu'ont les neutrophiles à répondre à un nouveau chimioattractant CXC (Doroshenko T et al, 2002). Par ailleurs, plusieurs études indiquent que les PN de patients cirrhotiques sont déjà activés dans le sang puisque une augmentation de l'expression membranaires des molécules stockées dans les granules comme le CD11b, une augmentation de la production basale de FRO (Taïeb et al, 2000 ; Mookerjee RP et al., 2007 ; Bruns T et al, 2011) ou une concentration élevée de MPO dans le plasma (Nakamuta, Hepatology 1993) ont été observés. Cependant, à ce jour un rôle des protéases des PN dans la régulation de l'expression de la NADPH oxydase est resté inconnu.

Nos résultats indiquent que la stimulation des neutrophiles de donneurs sains par le fMLP induit une dégradation protéolytique rapide de la gp91<sup>phox</sup> comme le démontre la perte progressive de la bande mère (91 kDa) et la génération simultanée d'un produit de dégradation d'environ 20 kDa. Ce résultat est confirmé à l'aide d'un autre anticorps reconnaissant également la partie extracellulaire de la gp91<sup>phox</sup> (Figure annexe 4). L'expression de la p22<sup>phox</sup> a elle aussi



été réduite suite à cette stimulation mais plus tardivement (figure 2, manuscrit 2). A l'inverse, ni l'expression de la  $p47^{phox}$ , ni celle de la  $p67^{phox}$ , n'ont été modifiées par cette stimulation. La diminution d'expression de la  $gp91^{phox}$  apparaît plus précocement (dès 15 à 20min) que la diminution de la  $p22^{phox}$  (figure 2, manuscrit 2). Cela suggère que c'est la  $gp91^{phox}$  qui subirait d'abord une dégradation protéolytique, la diminution de la  $p22^{phox}$  en serait une conséquence s'expliquant alors par l'instabilité de la protéine en absence de  $gp91^{phox}$ . Une telle observation a été proposée avec les patients CGD où une diminution de l'expression de la  $p22^{phox}$  a été observée alors que seul le gène codant pour la  $gp91^{phox}$  était muté (Parkos CA et al, 1989). M.T. Quinn et collaborateurs avaient déjà observé que la dégradation de la  $gp91^{phox}$  était possible après traitement d'une préparation de membranes de neutrophiles par une protéase bactérienne (V8). Ils avaient également observé l'apparition de deux produits dégradés d'une vingtaine de kDa (Quinn MT et al, 1992). D'autres équipes ont également fait état d'une dégradation de la  $gp91^{phox}$  via divers autres mécanismes : une implication du protéasome entraînant une diminution de la production de FRO induite par le PMA (Chen ATVB 2012) mais également via un nouveau phénomène qui implique une protéine membranaire NRROS (Negative Regulator of ROS) et qui contribue elle aussi à la dégradation protéolytique de la  $gp91^{phox}$  après activation des PN (Rajkumar Nature 2014). Par rapport à cela, nos résultats obtenus avec des PN sains montrent que cette dégradation de la  $gp91^{phox}$  est un moyen de réguler le niveau d'expression membranaire de la  $gp91^{phox}/p22^{phox}$ . Cette dégradation est observée dès l'utilisation de faibles concentrations de fMLP (25 nM) (Fig. S1, manuscrit 2). Cependant, dans un contexte d'inflammation chronique comme dans le cas de la cirrhose hépatique alcoolique décompensée, une diminution de l'expression de la  $gp91^{phox}$  pourrait donc contribuer aux déficits de production de FRO par les PN.

### **3.1.8 L'élastase contribue à la dégradation protéolytique de $gp91^{phox}$ induite par le fMLP dans les neutrophiles, et dans le plasma des patients cirrhotiques.**

Afin d'identifier les protéases potentiellement responsables de la dégradation de la  $gp91^{phox}$ , une analyse informatique a été entreprise à l'aide de la banque de donnée MEROPS (Table S1 manuscrit 2). L'avantage de cette approche réside dans le fait qu'elle a été initiée à l'aveugle, c'est à dire qu'à partir de la séquence de la  $gp91^{phox}$ , l'interrogation de la base de

donnée permet d'identifier toutes les protéases qui ont une probabilité de cliver la gp91<sup>phox</sup>. Parmi les 6 protéases identifiées, l'élastase s'est avérée la seule protéase issue du neutrophile.

Afin d'étudier un rôle de l'élastase dans la dégradation de la gp91<sup>phox</sup> des neutrophiles, deux approches complémentaires ont été initiées. La première a consisté à traiter les neutrophiles par l'élastase purifiée et la deuxième à l'aide de l'inhibiteur pharmacologique de l'élastase (NEI) utilisé en clinique (Revue Obayashi H et al, 2002), le N-(Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-Valine chloromethylketone dont les effets ont été examinés sur la dégradation de la gp91<sup>phox</sup> induite par le fMLP ou le surnageant issu de la dégranulation des neutrophiles. Les résultats montrent que l'élastase purifiée induit une dégradation du même ordre que celle observée avec fMLP. Par ailleurs, l'inhibiteur de l'élastase bloque bien la dégradation de gp91<sup>phox</sup> induite par le fMLP et le surnageant de dégranulation, suggérant une contribution de l'activité de l'élastase. A ce stade de l'étude, le mode d'action exact de l'élastase reste à clarifier, impliquant potentiellement une dégradation directe des boucles externes de la gp91<sup>phox</sup> (page 53), et/ou un effet indirect sur d'autres protéines membranaires pouvant induire un processus de dégradation intracellulaire de la gp91<sup>phox</sup>.

L'élastase est une protéase dont le motif consensus de clivage est très hétérogène rendant alors difficile la caractérisation précise d'un site de clivage. Afin de tenter d'identifier la ou les régions de la gp91<sup>phox</sup> préférentiellement ciblées, l'analyse de la forme de bas poids moléculaire de la gp91<sup>phox</sup> a été effectuée en utilisant trois anticorps dirigés contre 3 épitopes différents de la gp91<sup>phox</sup>, respectivement contre la dernière boucle extracellulaire, contre le domaine FAD et enfin contre le domaine NADPH (Figure annexe 4, D). Les deux anticorps dirigés contre les domaines FAD et NADPH reconnaissent deux peptides de bas poids moléculaires, l'un faisant approximativement 26-28 kDa et l'autre 22-24 kDa tandis que l'anticorps reconnaissant la dernière boucle extracellulaire ne reconnaît que le peptide 26-28 kDa. Ce résultat suggère alors qu'un site de coupure après la dernière boucle extracellulaire pourrait être considéré. Cependant à l'aide des données de la littérature (O'Donoghue AJ et al, 2013), 3 autres sites de clivages sont envisageables. Un site au niveau de la Valine en position 90 mais qui supposerait une 2<sup>e</sup> coupure autour de la position 270, dans la dernière boucle extracellulaire, afin de générer un produit de dégradation de 20 kDa. Ceci serait en accord avec nos observations et les travaux de Quinn et collaborateurs avaient identifié ces produits dégradés (28 et 22 et 14kDa) après traitement de la gp91<sup>phox</sup> purifiée ou des membranes de PN avec la protéase V8 de la bactérie *S. aureus* (Quinn MT et al, 1992) De plus, la forme 28 kDa continue à se dégrader en faveur de la forme 22 kDa et ces produits dégradés contiennent l'hème associé à la gp91<sup>phox</sup> sur les transmembranes III et V (Quinn MT et al, 1992). Un autre site de

clivage prédit informatiquement se situerait au niveau de la 2<sup>e</sup> boucle après l'isoleucine en position 160. Le premier produit dégradé généré serait d'approximativement 18 kDa et comprendrait les glycosylations. Cependant on ne peut pas exclure la possibilité que l'élastase puisse également indirectement induire l'activation d'autres protéases dans le milieu extracellulaire. Alternativement, l'élastase pourrait agir au niveau intracellulaire comme le suggèrent certains travaux (Le Gars M et al, 2013 ; Houghton AM et al, 2010) et dégrader directement la portion intracellulaire de la gp91<sup>phox</sup> ou en réduisant l'expression de protéines chaperonnes. Il serait ainsi important d'évaluer l'effet de l'élastase sur l'activité de NRROS ou HSP70 impliquées dans la dégradation protéolytique de la gp91<sup>phox</sup> (Noubade R et al, 2014 ; Chen F et al, 2012) ou sur l'expression de HSP90 qui protège la gp91<sup>phox</sup> de l'ubiquitinylation et de sa dégradation par le protéasome (Chen F et al, 2012). Cette dernière hypothèse est probable car le prétraitement des PN par l'inhibiteur du protéasome (MG132) dans nos conditions inhibe la dégradation de la gp91<sup>phox</sup> induite par le fMLP (Figure Annexe 6).

La possibilité que l'élastase puisse avoir un rôle pathologique est suggérée par le fait qu'elle est fortement présente dans le plasma des patients cirrhotiques. Sa contribution dans les déficiences d'explosion oxydative des neutrophiles a pu être montrée par plusieurs approches notamment avec le plasma des patients qui inhibe fortement l'explosion oxydative des PN sains comparativement au plasma d'individus sains, l'inhibiteur de l'élastase a un effet protecteur. Enfin, le plasma des patients induit la diminution de l'expression membranaire de la gp91<sup>phox</sup> à la surface des neutrophiles sains, effet qui est prévenu par l'inhibiteur de l'élastase (Figure 6, manuscrit 2). Ces résultats suggèrent donc fortement que l'élastase présente dans le plasma des patients pourrait être fortement impliquée dans la défaillance d'expression et d'activité NADPH oxydase observée chez les patients cirrhotiques. Cette implication pathologique de l'élastase est en accord avec d'autres travaux qui montrent une corrélation entre la sévérité des maladies chroniques du foie et la forte concentration d'élastase dans le sang de ces patients (Stanley AJ et al, 1996). Nos travaux permettent ainsi de décrire un nouveau mécanisme de régulation de l'expression de la gp91<sup>phox</sup> des neutrophiles sains impliquant l'élastase. Ce mécanisme serait prédominant chez les patients ayant une cirrhose hépatique décompensée. L'élastase est par ailleurs impliquée dans de nombreuses autres pathologies notamment pulmonaires (Shapiro SD et al, 2003) ou cardiovasculaires (Alam SR et al, 2012). Dans la mucoviscidose, l'élastase a été aussi impliquée dans la dégradation du CXCR1 (récepteur de l'IL8) à la surface des neutrophiles et est impliquée dans la réduction des fonctions de défense des neutrophiles (Hartl D et al, 2007). La dégradation de la gp91<sup>phox</sup> par l'élastase pourrait répondre au paradoxe de la mucoviscidose montrant une accumulation des neutrophiles dans

les poumons mais incapable d'éliminer les infections bactériennes. En outre, l'élastase agit aussi sur le mucus pulmonaire et aggrave la pathologie (Amitani R et al, 1991). L'élastase est impliquée dans l'emphysème pulmonaire (Shapiro SD et al, 2003) et son inhibiteur, le NEI, utilisé comme médicament a des effets protecteurs (Kuna P et al, 2012). Nos résultats obtenus en incubant des PN avec le plasma des patients en présence de NEI pendant 12H (Figure 6, manuscrit 2), montrent cependant que ce traitement favorise l'hyperexpression de la gp91<sup>phox</sup>. Ce résultat inattendu, s'il se confirme, soulèverait des questions quant aux conséquences éventuelles de la surexpression de la gp91<sup>phox</sup> des PN dans les poumons des patients.

Au niveau des maladies cardiovasculaires les neutrophiles ont été rapportés comme jouant un rôle majeur dans la formation de thrombose par l'intermédiaire de l'action conjointe de sérines protéases et des NET (Massberg S et al, 2010). L'élastase libérée par les neutrophiles induit la mort cellulaire par protéolyse et a un effet délétère pour les tissus vasculaires. Au cours du thrombus mural, c'est-à-dire au niveau des cavités du cœur, durant l'anévrisme, notamment de l'aorte, il a été rapporté que l'élastase se trouvant aux niveaux des thrombus empêche l'accrochage spontané des cellules mésenchymateuses à la matrice de fibrine. Ceci peut être un mécanisme par lequel l'élastase contribue à favoriser les anévrismes de l'aorte en empêchant la colonisation des thrombus (Fontaine V et al, 2004).

### **3.1.9 La défaillance de la production de FRO par les PN de patients peut être corrigée via l'activation des TLR7/8 - Un espoir thérapeutique !**

Au terme de notre étude expérimentale des dysfonctions des PN de patients cirrhotiques, il apparait que la défaillance de leur production de FRO met en jeu plusieurs processus sans doute imbriqués comportant une dégradation de la gp91<sup>phox</sup> membranaire par des protéases principalement par l'élastase, un défaut de resynthèse de la NOX2 mais également un déficit de signalisation intracellulaire (phosphorylation de p38-MAPK). Les p38-MAPK jouent également un rôle important dans la signalisation de nombreux autres récepteurs de l'immunité innée, notamment les TLR (Alvarez ME et al, 2006 ; Makni-Maalej K et al, 2012). L'activation de ces TLR par des agonistes synthétiques (3M002 et CL097) stimule une production faible de FRO dans les PN normaux (Janke M et al, 2009) et favorise la production de FRO des PN normaux induite par le fMLP (Makni-Maalej K et al, 2012). De plus, l'agoniste de TLR7/8, le CL097, induit bien une phosphorylation de la Ser-345 de la p47<sup>phox</sup> et contribue à augmenter l'activité NADPH oxydase des neutrophiles sains (Makni-Maalej K et al, 2012). Enfin, l'activation des TLR7/8 par le CL097 et R848 a permis l'amélioration des fonctions de défense des cellules immunitaires innées et la survie des souris lors d'un sepsis (Wynn JL et al, 2008).

Nous avons donc utilisé cette approche en vue de déterminer s'il était possible d'améliorer les fonctions déficientes des neutrophiles de patients atteints de cirrhose hépatique. Les résultats montrent que le CL097 seul stimule bien une faible production de FRO détectable par la mesure de chimioluminescence et a permis de rehausser le niveau de production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> des PN de patients cirrhotiques stimulés par le fMLP à un niveau proche de celui des PN normaux. De manière plus intéressante, cet agoniste est également actif dans le sang total des patients, ce qui est proche des conditions *in vivo*. Les mécanismes biochimiques de réparation induits par le CL097 ne sont pas complètement élucidés. Cependant, le CL097 seul est capable de stimuler des activités transductionnelles comme le montre l'augmentation du taux d'ARNm de la NOX2, et stimule également la synthèse de la NOX2 (Fig. 9 manuscrit 2). De plus, cette synthèse induite par le CL097 est inhibable par la Rapamycine et fait intervenir mTORC1 (Fig. 9 manuscrit 2). Cette observation est en accord avec le fait que mTORC1 joue un rôle central dans l'initiation de la traduction protéique comme développé durant l'étude bibliographique et qu'un autre agoniste du TLR8, R848, est capable d'induire l'activation de mTORC1 via l'adaptateur MyD88 (Schmitz, Eur J Immunol 2008). Par ailleurs, CL097 seul stimule également la voie p38-MAPK et rend persistant l'activation de la p38-MAPK induite par fMLP (Boussif A et al, manuscrit 3), alors qu'en son absence, l'activation de la p38-MAPK par fMLP est transitoire (Patel S et al, 2010). L'ensemble de ces résultats montre le potentiel du CL097 à potentialiser plusieurs étapes des mécanismes biochimiques responsables de la production de FRO, ce qui ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients. Ces résultats montrent en effet que les défaillances des neutrophiles de patients cirrhotiques ne sont pas irréversibles. Cette information est également supportée par des travaux antérieurs qui montrent que les endotoxines dans le plasma de patients développant une cirrhose hépatique alcoolique stable (non décompensée) sont responsables de la réduction de la phagocytose des PN et leur retrait permettait de restaurer cette activité défaillante (Mookerjee RP et al, 2007). Le choix du TLR7/8 comme cible thérapeutique potentielle est justifié par le fait que, outre les bénéfices rapportés par des travaux précédents, le TLR8 est un récepteur intracellulaire et donc à l'abri d'une potentielle dégradation par les protéases du plasma des patients cirrhotiques.

Certains agonistes de TLR7/8 font l'objet d'études cliniques et se sont avérés efficaces dans certaines pathologies infectieuses. Ainsi, l'administration orale du Résiquimod (R848) réduit la charge virale chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C (Pockros PJ et al, 2007). Le R848 en application locale réduit également l'infection génitale par le virus de l'Herpes (Spruance SL et al, 2001; Mark KE et al, 2007). Par ailleurs, l'agoniste du TLR8 humain (3M002) a été utilisé avec succès dans les essais d'immunisation de la protéine HIV-Gag chez le macaque (Wille-Reece U et al, 2005). Cependant, l'administration systémique du R848, bien

que bien toléré chez certains patients, provoque chez d'autres des effets secondaires tels que la fièvre, céphalées, frissons et lymphopénie. Par contre, les agonistes nucléotidiques (ARN virale et bactérien) ne semblent pas induire ces effets secondaires. Cependant, les fortes concentrations de nucléase dans les PN humains constituent pour le moment un frein pour l'activation de TLR8 dans les PN par les nucléotides (Janke M et al, 2009). Pour l'avenir, des agonistes de TLR8 seront sans aucun doute évalués pour un bon nombre d'indications cliniques soit seuls ou combinés car l'activation de TLR8 a montré son efficacité pour augmenter la résistance à l'infection. Dans le cadre des réponses anti-infectieuses des neutrophiles humains, une stratégie idéale pour l'utilisation de ces agonistes serait de les administrer sous formes de nanoparticules. Ceci aurait l'avantage de cibler préférentiellement les neutrophiles sanguins car il a été montré que ces particules sont rapidement opsonisées dans le sang et phagocytées par les neutrophiles via les récepteurs Fc (Wang Z et al, 2014). Ceci permettrait de limiter les effets secondaires liés à l'activation de nombreux autres types cellulaires. Dans cette perspective, nos résultats montrant que des agonistes de TLR7/8 sont capables de corriger les déficits de production de FNO dans le sang des patients font l'objet d'un dossier de demande de brevet européen (EP15305716) par l'Inserm-Transfert, et concernent d'une manière générale les patients immunodéprimés.

## **IV. CONCLUSIONS GENERALES**

# CONCLUSIONS GENERALES

Cette étude sur l'explosion oxydative des neutrophiles sains et de patients atteints de cirrhose hépatique alcoolique décompensée a apporté de nouvelles données physiologiques, biochimiques et moléculaires sur la régulation de l'activité NADPH oxydase et ses implications physiopathologiques. Nous avons ainsi identifié la protéine kinase mTOR comme un nouvel effecteur majeur de l'explosion oxydative des neutrophiles. Elle agit en amont de la p38-MAPK qui phosphoryle la Ser345 de la p47<sup>phox</sup> identifiant ainsi une nouvelle voie d'activation de la NADPH oxydase par les peptides bactériens fMLP, l'axe mTOR/p38-MAPK/p47<sup>phox</sup>. L'étude de l'explosion oxydative des neutrophiles de patients cirrhotiques a permis de mettre en évidence un défaut d'expression de mTOR, entraînant une défaillance d'activation la voie p38-MAPK/p47<sup>phox</sup> et d'activité NADPH oxydase. De plus, le médicament immunosuppresseur Rapamycine, inhibiteur de mTOR, aggrave cette défaillance, ce qui soulève des réserves quant à l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR notamment chez des patients immunodéprimés. Les neutrophiles de patients cirrhotiques présentent également un déficit d'expression de la p47<sup>phox</sup>, la p22<sup>phox</sup> et la gp91<sup>phox</sup> ; cette dernière subissant une dégradation protéolytique insoupçonnée jusqu'alors impliquant l'élastase présente dans le plasma des patients ou libérée lors de la stimulation des PN par le peptide bactérien fMLP. Enfin, la déficience fonctionnelle des neutrophiles de patients a pu être corrigée *ex vivo* dans des neutrophiles isolés et dans du sang total des patients cirrhotiques à l'aide d'un agoniste de récepteurs TLR7/8, le CL097 et d'autres plus efficaces. Ces agonistes agissent en favorisant la transcription du gène de la gp91<sup>phox</sup> et sa synthèse protéique.

Au final, cette thèse contribue à de nouvelles avancées sur la régulation de l'explosion oxydative des neutrophiles normaux et pathologiques, et propose de nouvelles pistes thérapeutiques en vue de restaurer cette fonction majeure de défense anti-infectieuse chez certains patients immunodéprimés.



## V. PERSPECTIVES

Les nouvelles connaissances fondamentales que nous avons apportées durant cette thèse concernant la régulation de l'explosion oxydative des PN normaux et les défaillances dans les PN pathologiques nous ont permis de proposer une stratégie permettant de corriger le déficit de production de FRO de neutrophiles de patients cirrhotiques déficients. Ce projet constitue une partie importante de nos travaux futurs en raison du dossier de brevet en cours. Nous avons pour cela utilisé comme outil un agoniste des TLR7/8 qui a permis d'augmenter la phosphorylation des MAPK induite par le fMLP et de la p47<sup>phox</sup> ainsi que l'expression de la gp91<sup>phox</sup>. D'autres agonistes de la même famille (imidazoquinoline) sont en cours d'évaluation et un analogue du CL097 s'est avéré beaucoup plus efficace dans le modèle de sang total. Ces agonistes seront testées dans un premier temps dans un modèle murin de sepsis disponible dans le Centre (Pinheiro da Silva F et al, 2007) afin d'évaluer leur efficacité *in vivo*. Ensuite, les molécules seront testées sous formes de nanoparticules en vue de cibler principalement les neutrophiles afin de limiter les effets secondaires observées chez des patients (Pockros PJ et al, 2007). Les nanoparticules d'albumine seront ainsi privilégiées car elles ont récemment montré leur efficacité pour délivrer des agents pharmacologiques dans les neutrophiles *in vivo* et traiter les maladies vasculaires (Wang Z et al, 2014). Les particules seront préparées de manière standard par la méthode de désolvatation de l'albumine (Wang Z et al, 2014) et injectées par voie veineuse dans la queue des rats. Le choix du rat est justifié par le fait que leurs neutrophiles sont plus proches de ceux de l'homme quant à la production de FRO (Perianin A et al, 1985 ; Lenoir M et al, 2005) que les neutrophiles de souris. En fonction des difficultés, d'autres particules pourront être testées, notamment des vésicules à base de lipides (Mérian et al 2013) dans lesquels seront emprisonnés les agonistes des TLR7/8. Par la suite, ces agonistes synthétiques de la famille des imidazoquinoline seront remplacées par des ligands naturels stabilisés de TLR7 (petit ARN simple et double brin) et de TLR8 (ARN simple brin) dépourvu d'effets secondaires. Enfin, en prévision des tests futures chez l'homme, les nanoparticules seront également étudiées *ex vivo* sur des PN purifiés et du sang total de patients afin d'évaluer leurs effets bénéfiques sur la production de FRO, la signalisation intracellulaire et les éventuels effets toxiques. D'une manière générale, ce projet serait bénéfique aux patients qui présentent des déficiences immunitaires d'origine diverse (certaines CGD, ARDS, maladie de Crohn, infections virales, médicaments, brûlures, radiothérapie, chimiothérapie), ce qui représente des milliers de personnes en France. Une des retombées non négligeables de l'expertise attendue avec les nanoparticules d'une part et des réseaux de signalisation intracellulaires des neutrophiles d'autre part, serait d'utiliser les nanoparticules chargées avec

des inhibiteurs des effecteurs majeurs de la signalisation intracellulaire des PN. Ces nouvelles particules pourront ainsi réduire l'état de suractivation des PN et leur production excessive de FRO et pourraient être bénéfiques dans différentes pathologies notamment l'arthrite, les vascularites et pathologies vasculaires.

Le deuxième axe de nos perspectives concerne la dégradation protéolytique de la gp91<sup>phox</sup> qui pourrait contribuer à expliquer la réduction de son expression dans les neutrophiles des patients cirrhotiques et leur défaillance de production de FRO. Nous étudierons le mécanisme de cette dégradation afin d'évaluer s'il s'agit d'une protéolyse directe par l'élastase ou indirecte. Cela impliquera l'étude des interactions entre l'élastase et la gp91<sup>phox</sup> (méthode Duolink en cours) et l'identification de sites de clivage sur la protéine. L'implication d'autres protéases majeures des PN sera également étudiée (cathepsine G, chymotrypsine). Par ailleurs, l'inhibiteur de l'élastase utilisé dans un modèle *ex vivo* reproduisant les défaillances de production de FRO des PN de patients cirrhotiques a permis d'augmenter considérablement l'expression membranaire de la gp91<sup>phox</sup>, à un niveau supérieur au niveau initial et a permis de restaurer la production de FRO. Ces résultats pourraient alors ouvrir la possibilité d'utiliser l'inhibiteur de l'élastase dans un modèle de cirrhose hépatique murine avancée afin d'évaluer sa capacité à restaurer les fonctions défaillantes des neutrophiles. Néanmoins, ils permettent d'envisager que l'utilisation de cet inhibiteur pourrait entraîner une hyper activation des neutrophiles. Il serait alors important d'évaluer si cet inhibiteur utilisé en clinique induit une hyperactivation des neutrophiles, notamment avec des PN du liquide bronchoalvéolaire de patients qui ont un emphysème pulmonaire.

## VI. REFERENCES

- Abadie V**, Badell E, Douillard P, Ensergueix D, Leenen PJ, Tanguy M, Fiette L, Saeland S, Gicquel B, Winter N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1843-50
- Abi Abdallah DS**, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol*. 2011 May;23(5):317-26
- Acosta-Jaquez HA**, Keller JA, Foster KG, Ekim B, Soliman GA, Feener EP, Ballif BA, Fingar DC. Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Mol Cell Biol*. 2009 Aug;29(15):4308-24
- Ago T**, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H. Phosphorylation of p47<sup>phox</sup> directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15;100(8):4474-9
- Ago T**, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H. Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*. 1999 Nov 19;274(47):33644-53
- Ahearn IM**, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Dec 22;13(1):39-51
- Akira S**. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003 Feb;15(1):5-11
- Alam SR**, Newby DE, Henriksen PA. Role of the endogenous elastase inhibitor, elafin, in cardiovascular injury: from epithelium to endothelium. *Biochem Pharmacol*. 2012 Mar 15;83(6):695-704
- Albanesi M**, Mancardi DA, Jönsson F, Iannascoli B, Fiette L, Di Santo JP, Lowell CA, Bruhns P. Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice. *Blood*. 2013 Oct 31;122(18):3160-4
- Albrich JM**, McCarthy CA, Hurst JK. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jan;78(1):210-4
- Alessi DR**, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*. 1996 Dec 16;399(3):333-8
- Altamirano J**, Miquel R, Katoonizadeh A, Abalde JG, Duarte-Rojo A, Louvet A, Augustin S, Mookerjee RP, Michelena J, Smyrk TC, Buob D, Leteurtre E, Rincón D, Ruiz P, García-Pagán JC, Guerrero-Marquez C, Jones PD, Barritt AS 4th, Arroyo V, Bruguera M, Bañares R, Ginès P, Caballería J, Roskams T, Nevens F, Jalan R, Mathurin P, Shah VH, Bataller R. A

histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*. 2014 May;146(5):1231-9.e1-6

**Alvarado-Kristensson M, Andersson T.** Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38-MAPK and its substrate caspase 3. *J Biol Chem*. 2005 Feb 18;280(7):6238-44

**Alvarez ME, Fuxman Bass JI, Geffner JR, Fernández Calotti PX, Costas M, Coso OA, Gamberale R, Vermeulen ME, Salamone G, Martinez D, Tanos T, Trevani AS.** Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation. *J Immunol*. 2006 Sep 15;177(6):4037-46

**Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ.** Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 10;106(10):4018-23

**Amitani R, Wilson R, Rutman A, Read R, Ward C, Burnett D, Stockley RA, Cole PJ.** Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991 Jan;4(1):26-32

**Aoshiba K, Yasui S, Hayashi M, Tamaoki J, Nagai A.** Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils. *J Immunol*. 1999 Feb 1;162(3):1692-700

**Arnljots K, Sørensen O, Lollike K, Borregaard N.** Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia*. 1998 Nov;12(11):1789-95

**Arteel GE.** Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology*. 2003 Mar;124(3):778-90

**Arthur MJ, Stanley A, Iredale JP, Rafferty JA, Hembry RM, Friedman SL.** Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem J*. 1992 Nov 1;287 ( Pt 3):701-7

**Arthur MJ.** Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Aug;279(2):G245-9

**Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, Burroughs AK.** Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*. 2010 Oct;139(4):1246-56

**Astiz ME, DeGent GE, Lin RY, Rackow EC.** Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med*. 1995 Feb;23(2):265-71

**Babior BM.** The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J*. 2002 Nov;4(11):1023-4

**Baggiolini M, Boulay F, Badwey JA, Curnutte JT.** Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J*. 1993 Aug;7(11):1004-10

**Bai F, Kong KF, Dai J, Qian F, Zhang L, Brown CR, Fikrig E, Montgomery RR.** A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J Infect Dis*. 2010 Dec 15;202(12):1804-12

**Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, Jiang Y.** Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science*. 2007 Nov 9;318(5852):977-80

**Baldrige CW and Gerard RW.** The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol*. 1933 ; 103 : 235-236

- Bank U**, Küpper B, Reinhold D, Hoffmann T, Ansorge S. Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett.* 1999 Nov 19;461(3):235-40
- Barlic J**, Andrews JD, Kelvin AA, Bosinger SE, DeVries ME, Xu L, Dobransky T, Feldman RD, Ferguson SS, Kelvin DJ. Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1. *Nat Immunol.* 2000 Sep;1(3):227-33
- Bautista AP**. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol.* 2002 May;27(1):17-21
- Bargagli E**, Penza F, Vagaggini C, Magi B, Perari MG, Rottoli P. Analysis of carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with diffuse lung diseases. *Lung.* 2007 May-Jun;185(3):139-44
- Beauvillain C**, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guernonprez P, Barnaba V, Jeannin P. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood.* 2007 Oct 15;110(8):2965-73
- Bedard K**, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313
- Belambri SA**, Hurtado-Nedelec M, Senator A, Makni-Maalej K, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Dang PM, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox is required for receptor-mediated NADPH oxidase/NOX2 activation in Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *Am J Blood Res.* 2012;2(3):187-93
- Bell JK**, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 2003 Oct;24(10):528-33
- Bellocq A**, Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Bernaudin JF, Mayaud C, Milleron B, Baud L, Cadranel J. Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol.* 1998 Jan;152(1):83-92
- Bengis-Garber C**, Gruener N. Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst. *Cell Signal.* 1996 Jun;8(4):291-6
- Ben-Levy R**, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol.* 1998 Sep 24;8(19):1049-57
- Berstein G**, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM. Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell.* 1992 Aug 7;70(3):411-8
- Betten A**, Bylund J, Christophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, Dahlgren C. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1221-8
- Bianchi M**, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2619-22
- Biffl WL**, Moore EE, Zallen G, Johnson JL, Gabriel J, Offner PJ, Silliman CC. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure. *Surgery.* 1999 Aug;126(2):198-202

- Blachier M**, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013 Mar;58(3):593-608
- Bode JC**, Bode C, Heidelberg R, Dürr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology*. 1984 Feb;31(1):30-4
- Bohler MC**, Seger RA, Mouy R, Vilmer E, Fischer A, Griscelli C. A study of 25 patients with chronic granulomatous disease: a new classification by correlating respiratory burst, cytochrome b, and flavoprotein. *J Clin Immunol*. 1986 Mar;6(2):136-45
- Bokoch GM**. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. 1995 Sep 1;86(5):1649-60
- Borregaard N**, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3503-21
- Borregaard N**, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol*. 1983 Jul;97(1):52-61
- Borregaard N**. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010 Nov 24;33(5):657-70
- Bosch J**, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol*. 2008;48 Suppl 1:S68-92
- Boudier C**, Bieth JG. Mucus proteinase inhibitor: a fast-acting inhibitor of leucocyte elastase. *Biochim Biophys Acta*. 1989 Mar 16;995(1):36-41
- Boulay F**, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry*. 1990 Dec 18;29(50):11123-33
- Boussetta T**, Gougerot-Pocidalo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM, El-Benna J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):5795-802
- Boussetta T**, Gougerot-Pocidalo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM, El-Benna J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):5795-802
- Branzk N**, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1017-25
- Brinkmann V**, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5
- Brinkmann V**, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012 Sep 3;198(5):773-83
- Brown KA**, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006 Jul 8;368(9530):157-69

- Brown SL**, Jala VR, Raghuwanshi SK, Nasser MW, Haribabu B, Richardson RM. Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G(i) and G(q) in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):3242-9
- Broz P**, Ohlson MB, Monack DM. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut Microbes*. 2012 Mar-Apr;3(2):62-70
- Brugarolas JB**, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG Jr. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell*. 2003 Aug;4(2):147-58
- Bruns T**, Peter J, Hagel S, Herrmann A, Stallmach A. The augmented neutrophil respiratory burst in response to *Escherichia coli* is reduced in liver cirrhosis during infection. *Clin Exp Immunol*. 2011 Jun;164(3):346-56
- Bruyn GAW**. Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a 3-month, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study *Ann Rheum Dis*. 2008
- Byles V**, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, Horng T. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun*. 2013
- Cai H**, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2003 Sep;24(9):471-8
- Calvin J**, Price CP. Measurement of serum alpha 1-antichymotrypsin by immunoturbidimetry. *Ann Clin Biochem*. 1986 Mar;23
- Campbell AC**, Dronfield MW, Toghil PJ, Reeves WG. Neutrophil function in chronic liver disease. *Clin Exp Immunol*. 1981 Jul;45(1):81-9
- Campbell EL**, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, Glover LE, McNamee EN, Bowers BE, Bayless AJ, Scully M, Saeedi BJ, Golden-Mason L, Ehrentaut SF, Curtis VF, Burgess A, Garvey JF, Sorensen A, Nemenoff R, Jedlicka P, Taylor CT, Kominsky DJ, Colgan SP. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity*. 2014 Jan 16;40(1):66-77
- Campbell EL**, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, Glover LE, McNamee EN, Bowers BE, Bayless AJ, Scully M, Saeedi BJ, Golden-Mason L, Ehrentaut SF, Curtis VF, Burgess A, Garvey JF, Sorensen A, Nemenoff R, Jedlicka P, Taylor CT, Kominsky DJ, Colgan SP. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity*. 2014 Jan 16;40(1):66-77
- Carnesecchi S**, Pache JC, Barazzone-Argiroffo C. NOX enzymes: potential target for the treatment of acute lung injury. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Jul;69(14):2373-85. doi: 10.1007/s00018-012-1013-6.
- Carracedo A**, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*. 2008 Sep;118(9):3065-74
- Carré A**, Louzada RA, Fortunato RS, Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Ogryzko V, de Carvalho DP, Grasberger H, Leto TL, Dupuy C. When an Intramolecular Disulfide Bridge Governs the Interaction of DUOX2 with Its Partner DUOXA2. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Apr 20. [Epub ahead of print]
- Casanova-Acebes M**, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, Kunisaki Y, Zhang D, van Rooijen N, Silberstein LE, Weber C, Nagasawa T, Frenette PS,

- Castrillo A, Hidalgo A. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013 May 23;153(5):1025-35
- Cassatella** MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol*. 1999;73:369-509
- Cavaliere** F, Benito-Muñoz M, Panicker M, Matute C. NMDA modulates oligodendrocyte differentiation of subventricular zone cells through PKC activation. *Front Cell Neurosci*. 2013 Dec 18;7:261
- Chen** F, Yu Y, Qian J, Wang Y, Cheng B, Dimitropoulou C, Patel V, Chadli A, Rudic RD, Stepp DW, Catravas JD, Fulton DJ. Opposing actions of heat shock protein 90 and 70 regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase stability and reactive oxygen species production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Dec;32(12):2989-99.
- Chen** J, Tang H, Hay N, Xu J, Ye RD. Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions. *Blood*. 2010 May 27;115(21):4237-46
- Chen** Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB, McLeish KR. Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol*. 2003 May 15;170(10):5302-8
- Chen** W, Ma T, Shen XN, Xia XF, Xu GD, Bai XL, Liang TB. Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2-mTOR pathway. *Cancer Res*. 2012
- Cheng** SW, Fryer LG, Carling D, Shepherd PR. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem*. 2004 Apr 16;279(16):15719-22
- Chessa** TA, Anderson KE, Hu Y, Xu Q, Rausch O, Stephens LR, Hawkins PT. Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):6027-36
- Chiang** GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem*. 2005 Jul 8;280(27):25485-90
- Cholongitas** E, Papatheodoridis GV, Vangelis M, Terreni N, Patch D, Burroughs AK. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Dec;22(11-12):1079-89
- Chou** MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol*. 1998 Sep 24;8(19):1069-77
- Chtanova** T, Schaeffer M, Han SJ, van Dooren GG, Nollmann M, Herzmark P, Chan SW, Satija H, Camfield K, Aaron H, Striepen B, Robey EA. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):487-96
- Chua** F, Laurent GJ. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jul;3(5):424-7
- Clark** RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest*. 1990 Mar;85(3):714-21
- Clark** SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes



P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):463-9

**Clark SR.**, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood *Nat. Med.* 2007

**Colletti LM**, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology.* 1996 Mar;23(3):506-14

**Cooray SN**, Gobbetti T, Montero-Melendez T, McArthur S, Thompson D, Clark AJ, Flower RJ, Perretti M. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Nov 5;110(45):18232-7

**Copp J**, Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res.* 2009 Mar 1;69(5):1821-7

**Cross AR**, Heyworth PG, Rae J, Curnutte JT. A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b. *J Biol Chem.* 1995 Apr 7;270(14):8194-200

**Cuenca-Estrella M**, Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Rodriguez-Tudela JL. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Nov;32 Suppl 2:S143-7

**Cui BB**, Tan CY, Schorn C, Tang HH, Liu Y, Zhao Y. Neutrophil extracellular traps in sterile inflammation: the story after dying? *Autoimmunity.* 2012 Dec;45(8):593-6

**Culshaw S**, Millington OR, Brewer JM, McInnes IB. Murine neutrophils present Class II restricted antigen. *Immunol Lett.* 2008 Jun 15;118(1):49-54

**Cumashi A**, Ansuini H, Celli N, De Blasi A, O'Brien PJ, Brass LF, Molino M. Neutrophil proteases can inactivate human PAR3 and abolish the co-receptor function of PAR3 on murine platelets. *Thromb Haemost.* 2001 Mar;85(3):533-8

**Curnutte JT**, Babior BM, Karnovsky ML. Fluoride-mediated activation of the respiratory burst in human neutrophils. A reversible process. *J Clin Invest.* 1979 Apr;63(4):637-47

**D'Amico G**, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol.* 2006 Jan;44(1):217-31

**Dalle-Donne I**, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003 Mar;329(1-2):23-38

**Dan HC**, Ebbs A, Pasparakis M, Van Dyke T, Basseres DS, Baldwin AS. Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ). *J Biol Chem.* 2014 Sep 5;289(36):25227-40

**Dang PM**, Hakim J, P $\acute{e}$ rianin A. Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994 Aug 8;349(3):338-42

**Dang PM**, Rais S, Hakim J, P $\acute{e}$ rianin A. Redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils stimulated by formyl peptides and phorbol myristate acetate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jul 17;212(2):664-72

- Dang PM**, Fontayne A, Hakim J, El Benna J, Périain A. Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):1206-13
- Dang PM**, Cross AR, Quinn MT, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4262-5
- Dang PM**, Morel F, Gougerot-Pocidalo MA, El Benna J. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry*. 2003 Apr 22;42(15):4520-6
- Dang PM**, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. A specific p47phox –serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):2033-43
- de Mendez I**, Homayounpour N, Leto TL. Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):2177-85
- De Yang**, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1069-74
- DeChatelet LR**, Shirley PS, Johnston RB Jr. Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*. 1976 Apr;47(4):545-54
- Delano MJ**, Thayer T, Gabrilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield RD, Scumpia PO, Cuenca AG, Warner E, Wallet SM, Wallet MA, O'Malley KA, Ramphal R, Clare-Salzer M, Efron PA, Mathews CE, Moldawer LL. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J Immunol*. 2011 Jan 1;186(1):195-202
- DeLeo FR**, Allen LA, Apicella M, Nauseef WM. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol*. 1999 Dec 15;163(12):6732-40
- DeMeo AN**, Andersen BR. Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients. *N Engl J Med*. 1972 Apr 6;286(14):735-40
- Dennis EA**, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J*. 1991 Apr;5(7):2068-77.
- Dewas C**, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):5238-44
- DeYoung MP**, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*. 2008 Jan 15;22(2):239-51
- Di Carlo E**, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood*. 2001 Jan 15;97(2):339-45
- Diebold BA**, Bokoch GM. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):211-5

**Djerdjouri B**, Lenoir M, Giroud JP, Périanin A. Contribution of mitogen-activated protein kinase to stimulation of phospholipase D by the chemotactic peptide fMet-Leu-Phe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Oct 22;264(2):371-5

**Doerschuk CM**. Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. *Respir Res*. 2000;1(3):136-40

**Dollery CM**, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation*. 2003 Jun 10;107(22):2829-36

**Donnelly SC**, MacGregor I, Zamani A, Gordon MW, Robertson CE, Steedman DJ, Little K, Haslett C. Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 May;151(5):1428-33

**Döring G**, Frank F, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4842-50

**Doroshenko T**, Chaly Y, Savitskiy V, Maslakova O, Portyanko A, Gorudko I, Voitenok NN. Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2668-71

**Dunlop EA**, Dodd KM, Seymour LA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1-mediated phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 requires multiple protein-protein interactions for substrate recognition. *Cell Signal*. 2009 Jul;21(7):1073-84

**Dusi S**, Della Bianca V, Grzeskowiak M, Rossi F. Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils. *Biochem J*. 1993 Feb 15;290 ( Pt 1):173-8

**Dusi S**, Della Bianca V, Grzeskowiak M, Rossi F. Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils. *Biochem J*. 1993 Feb 15;290 ( Pt 1):173-8

**Düvel K**, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 2010 Jul 30;39(2):171-83

**Eash KJ**, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 2010 Jul;120(7):2423-31

**Eash KJ**, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*. 2009 May 7;113(19):4711-9

**Eid AA**, Ford BM, Bhandary B, de Cassia Cavaglieri R, Block K, Barnes JL, Gorin Y, Choudhury GG, Abboud HE. Mammalian target of rapamycin regulates Nox4-mediated podocyte depletion in diabetic renal injury. *Diabetes*. 2013 Aug;62(8):2935-47

**El Benna J**, Faust LP, Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem*. 1994 Sep 23;269(38):23431-6

- El Benna J, Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM.** Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Oct 15;334(2):395-400.
- El Benna J, Hayem G, Dang PM, Fay M, Chollet-Martin S, Elbim C, Meyer O, Gougerot-Pocidalo MA.** NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy. *Inflammation.* 2002 Dec;26(6):273-8
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Braut-Boucher F.** p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med.* 2009 Apr 30;41(4):217-25
- Enslen H, Branchio DM, Davis RJ.** Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J.* 2000 Mar 15;19(6):1301-11
- Eriksson S.** pulmonary emphysema and alpha1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand.* 1964 Feb;175:197-205.
- Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V.** Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* 2009;1(3):181-93
- Exton JH.** Regulation of phospholipase D. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jul 30;1439(2):121-33
- Fang Y, Park IH, Wu AL, Du G, Huang P, Frohman MA, Walker SJ, Brown HA, Chen J.** PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr Biol.* 2003 Dec 2;13(23):2037-44
- Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J.** Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science.* 2001 Nov 30;294(5548):1942-5
- Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H.** Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol.* 1995 Mar;57(3):368-74
- Faurschou M, Borregaard N.** Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003 Nov;5(14):1317-27
- Faust LR, el Benna J, Babior BM, Chanock SJ.** The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest.* 1995 Sep;96(3):1499-505
- Fernandez D, Perl A.** mTOR signaling: a central pathway to pathogenesis in systemic lupus erythematosus? *Discov Med.* 2010 Mar;9(46):173-8
- Figueiredo A, Romero-Bermejo F, Perdigoto R, Marcelino P.** The end-organ impairment in liver cirrhosis: appointments for critical care. *Crit Care Res Pract.* 2012;2012:539412. doi: 10.1155/2012/539412. Epub 2012 May 16
- Fischer B, Voynow J.** Neutrophil elastase induces MUC5AC messenger RNA expression by an oxidant-dependent mechanism. *Chest.* 2000 May;117(5 Suppl 1):317S-20S
- Fisher A, Seguel JM, de la Torre AN, Wilson D, Merchant A, Arora RK, Koneru B.** Effect of sirolimus on infection incidence in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2004 Feb;10(2):193-8
- Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM.** In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis.* 2000 Aug;182(2):526-33

- Foldenauer** ME, McClellan SA, Berger EA, Hazlett LD. Mammalian target of rapamycin regulates IL-10 and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. *J Immunol*. 2013 Jun 1;190(11):5649-58
- Fontaine** V, Touat Z, Mtairag el M, Vranckx R, Louedec L, Houard X, Andreassian B, Sebbag U, Palombi T, Jacob MP, Meilhac O, Michel JB. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol*. 2004 Jun;164(6):2077-87
- Fontayne** A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*. 2002 Jun 18;41(24):7743-50
- Forbes** LV, Moss SJ, Segal AW. Phosphorylation of p67phox in the neutrophil occurs in the cytosol and is independent of p47phox. *FEBS Lett*. 1999 Apr 23;449(2-3):225-9
- Foster** DA. Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Sep;1791(9):949-55
- Freeman** JL, Lambeth JD. NADPH oxidase activity is independent of p47phox in vitro. *J Biol Chem*. 1996 Sep 13;271(37):22578-82
- Fresquet** F, Pourageaud F, Leblais V, Brandes RP, Savineau JP, Marthan R, Muller B. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol*. 2006 Jul;148(5):714-23
- Freyberg** Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman M, Shields D. Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001 Apr;12(4):943-55
- Frias** MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*. 2006 Sep 19;16(18):1865-70
- Fridlender** ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8;16(3):183-94
- Friedman** SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000 Jan 28;275(4):2247-50
- Friedman** SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53
- Fronsdorf** K, Henkels KM, Frohman MA, Gomez-Cambronero J. Phosphatidic acid is a leukocyte chemoattractant that acts through S6 kinase signaling. *J Biol Chem*. 2010 May 21;285(21):15837-47
- Fuchs** A, Dagher MC, Vignais PV. Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J Biol Chem*. 1995 Mar 17;270(11):5695-7
- Fuchs** A, Bouin AP, Rabilloud T, Vignais PV. The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *Eur J Biochem*. 1997 Oct 15;249(2):531-9
- Fujii** M, Miyagi Y, Bessho R, Nitta T, Ochi M, Shimizu K. Effect of a neutrophil elastase inhibitor on acute lung injury after cardiopulmonary bypass. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010 Jun;10(6):859-62

- Fumagalli L**, Zhang H, Baruzzi A, Lowell CA, Berton G. The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol*. 2007 Mar 15;178(6):3874-85
- Furukawa S**, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1752-61
- Futosi K**, Németh T, Pick R, Vántus T, Walzog B, Mócsai A. Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood*. 2012 May 24;119(21):4981-91
- Gabriel A**, Kuddus RH, Rao AS, Watkins WD, Gandhi CR. Superoxide-induced changes in endothelin (ET) receptors in hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 1998 Oct;29(4):614-27
- Gadsby DC**, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 2006 Mar 23;440(7083):477-83.
- Ganesan S**, Faris AN, Comstock AT, Sonstein J, Curtis JL, Sajjan US. Elastase/LPS-exposed mice exhibit impaired innate immune responses to bacterial challenge: role of scavenger receptor A. *Am J Pathol*. 2012 Jan;180(1):61-72
- Ganguly D**, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B, Barrat FJ, Zal T, Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):1983-94
- García-Martínez JM**, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*. 2008 Dec 15;416(3):375-85
- Garcia-Romo GS**, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J, Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011 Mar 9;3(73):73ra20
- Garfia C**, García-Ruiz I, Solís-Herruzo JA. Deficient phospholipase C activity in blood polymorphonuclear neutrophils from patients with liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2004 May;40(5):749-56
- Garg V**, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, Sakhuja P, Sarin SK. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology*. 2012 Mar;142(3):505-512
- Geyer M**, Wittinghofer A. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 1997 Dec;7(6):786-92
- Gingras AC**, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszyńska A, Aebersold R, Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev*. 2001 Nov 1;15(21):2852-64
- Godoy MC**, Vos PM, Cooperberg PL, Lydell CP, Phillips P, Müller NL. Chest radiographic and CT manifestations of chronic granulomatous disease in adults. *AJR Am J Roentgenol*. 2008 Nov;191(5):1570-5
- Gomes I**, Jordan BA, Gupta A, Rios C, Trapaidze N, Devi LA. G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med (Berl)*. 2001 Jun;79(5-6):226-42

- Gomez-Cambronero J.** Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration. *FEBS Lett.* 2003 Aug 28;550(1-3):94-100
- Grasberger H, Refetoff S.** Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem.* 2006 Jul 7;281(27):18269-72
- Gregory AD, Houghton AM.** Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 2011 Apr 1;71(7):2411-6
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994 Jun;74(6):1141-8
- Griffiths G, Mayorga L.** Phagosome proteomes open the way to a better understanding of phagosome function. *Genome Biol.* 2007;8(3):207
- Groemping Y, Rittinger K.** Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J.* 2005 Mar 15;386(Pt 3):401-16
- Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM.** Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell.* 2006 Dec;11(6):859-71
- Gujral JS, Liu J, Farhood A, Hinson JA, Jaeschke H.** Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Mar;286(3):G499-507
- Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, Evers BM.** mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 2011 May 1;71(9):3246-56
- Gutkind JS.** Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE.* 2000 Jul 11;2000(40):re1
- Gwinn MR, Sharma A, De Nardin E.** Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1999 Oct;70(10):1194-201
- Ha SH, Kim DH, Kim IS, Kim JH, Lee MN, Lee HJ, Kim JH, Jang SK, Suh PG, Ryu SH.** PLD2 forms a functional complex with mTOR/raptor to transduce mitogenic signals. *Cell Signal.* 2006 Dec;18(12):2283-91
- Hack CE, Aarden LA, Thijs LG.** Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol.* 1997;66:101-95
- Hakkin A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, Waldmann H.** Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.* 2011 Feb;7(2):75-7
- Hannigan MO, Huang CK, Wu DQ.** Roles of PI3K in neutrophil function. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;282:165-75
- Hänsch GM, Wagner C.** Expression of MHC class II antigen and coreceptor molecules in polymorphonuclear neutrophils. *Chem Immunol Allergy.* 2003;83:45-63
- Hartfield PJ, Robinson JM.** Fluoride-mediated activation of the respiratory burst in electropermeabilized neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Sep 1;1054(2):176-80

- Hartl** D, Latzin P, Hordijk P, Marcos V, Rudolph C, Woischnik M, Krauss-Etschmann S, Koller B, Reinhardt D, Roscher AA, Roos D, Griesse M. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med.* 2007 Dec;13(12):1423-30
- Harty** MW, Muratore CS, Papa EF, Gart MS, Ramm GA, Gregory SH, Tracy TF Jr. Neutrophil depletion blocks early collagen degradation in repairing cholestatic rat livers. *Am J Pathol.* 2010 Mar;176(3):1271-81
- Hayashi** AA, Proud CG. The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Jun;292(6):E1647-55
- Hayashi** F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003 Oct 1;102(7):2660-9
- He** G, Karin M. NF- $\kappa$ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):159-68
- He** Y., Mammanial target of rapamycin and Rictor control neutrophil chemotaxis by regulating Rac/cdc42 activity and the actin cytoskeleton
- Heitman** J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 1991 Aug 23;253(5022):905-9
- Hernandez** PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet.* 2003 May;34(1):70-4
- Hernández-Negrete** I, Carretero-Ortega J, Rosenfeldt H, Hernández-García R, Calderón-Salinas JV, Reyes-Cruz G, Gutkind JS, Vázquez-Prado J. P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J Biol Chem.* 2007 Aug 10;282(32):23708-15
- Heyworth** PG, Shrimpton CF, Segal AW. Localization of the 47 kDa phosphoprotein involved in the respiratory-burst NADPH oxidase of phagocytic cells. *Biochem J.* 1989 May 15;260(1):243-8
- Hicks** AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Sanders AM, Weir HM, Du W, Kim J, Simpson AJ, Old LJ, Cui Z. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 16;103(20):7753-8
- Hirche** TO, Crouch EC, Espinola M, Brokelman TJ, Mecham RP, DeSilva N, Cooley J, Remold-O'Donnell E, Belaaouaj A. Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain. *J Biol Chem.* 2004 Jun 25;279(26):27688-98
- Hosokawa** N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell.* 2009 pr;20(7):1981-91
- Houghton** AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank J, Wong KK, Shapiro SD. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med.* 2010 Feb;16(2):219-23
- Howarth**, P. H., Babu, K. S., Arshad, H. S., Lau, L., Buckley, M., McConnell, W., Beckett, P., Al Ali, M., Chauhan, A., Wilson, S. J., Reynolds, A., Davies, D. E., Holgate, S. T. (2005)



- Tumour necrosis factor (TNF $\alpha$ ) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax* 60, 1012–101
- Hoyal CR**, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin JH, Tsiachlis PN, Babior BM. Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5130-5
- Hsu MH**, Chiang SC, Ye RD, Prossnitz ER. Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor is required for receptor internalization but not chemotaxis. *J Biol Chem*. 1997 Nov 21;272(47):29426-9
- Hsu PP**, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*. 2011 Jun 10;332(6035):1317-22
- Hubbard RC**, Ogushi F, Fells GA, Cantin AM, Jallat S, Courtney M, Crystal RG. Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest*. 1987 Nov;80(5):1289-95
- Hufford MM**, Richardson G, Zhou H, Manicassamy B, García-Sastre A, Enelow RI, Braciale TJ. Influenza-infected neutrophils within the infected lungs act as antigen presenting cells for anti-viral CD8(+) T cells. *PLoS One*. 2012;7(10)
- Hui L**, Rodrik V, Pielak RM, Knirr S, Zheng Y, Foster DA. mTOR-dependent suppression of protein phosphatase 2A is critical for phospholipase D survival signals in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):35829-35
- Hurley JH**. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1999 Mar 19;274(12):7599-602
- Hussain N**, Feld JJ, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Garcia-Eulate R, Ahlawat S, Koziel DE, Anderson V, Hilligoss D, Choyke P, Gallin JI, Liang TJ, Malech HL, Holland SM, Heller T. Hepatic abnormalities in patients with chronic granulomatous disease. *Hepatology*. 2007 Mar;45(3):675-83
- Ichijo H**, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997 Jan 3;275(5296):90-4
- Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J*. 2008 Jul 23;27(14):1919-31
- Imler JL**, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol*. 2001 Jul;11(7):304-11.
- Inoki K**, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002 Sep;4(9):648-57
- Inoki K**, Ouyang H, Li Y, Guan KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005 Mar;69(1):79-100
- Inoki K**, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*. 2006 Sep 8;126(5):955-68

- International Working Party.** Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology*. 1995 Sep;22(3):983-93
- Itakura A, McCarty OJ.** Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Aug 1;305(3):C348-54
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW.** Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. *Am J Physiol*. 1991 Dec;261(6 Pt 1):G1051-6
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW.** Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J*. 1990 Dec;4(15):3355-9
- Jaeschke H.** Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol*. 2002 May;27(1):23-7
- Jagavelu K, Routray C, Shergill U, O'Hara SP, Faubion W, Shah VH.** Endothelial cell toll-like receptor 4 regulates fibrosis-associated angiogenesis in the liver. *Hepatology*. 2010 Aug;52(2):590-601
- Janeway CA Jr, Medzhitov R.** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216
- Janke M, Poth J, Wimmenauer V, Giese T, Coch C, Barchet W, Schlee M, Hartmann G.** Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1026-33
- Jeppsson JO, Laurell CB, Fagerhol M.** Properties of isolated human alpha1-antitrypsins of Pi types M, S and Z. *Eur J Biochem*. 1978 Feb 1;83(1):143-53
- Jin B, Alter HJ, Zhang ZC, Shih JW, Esteban JM, Sun T, Yang YS, Qiu Q, Liu XL, Yao L, Wang HD, Cheng LF.** Reversibility of experimental rabbit liver cirrhosis by portal collagenase administration. *Lab Invest*. 2005 Aug;85(8):992-1002
- Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O, Babior BM.** Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem*. 1998 Dec 25;273(52):35147-52
- Joiner KA, Ganz T, Albert J, Rotrosen D.** The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J Cell Biol*. 1989 Dec;109(6 Pt 1):2771-82
- Jones SA, Mills KH, Harris J.** Autophagy and inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol*. 2013 Mar;91(3):250-8
- Kakimoto K, Kojima Y, Ishii K, Onoue K, Maeda H.** The suppressive effect of gelatin-conjugated superoxide dismutase on disease development and severity of collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immunol*. 1993 Nov;94(2):241-6
- Kang UB, Baek JH, Ryu SH, Kim J, Yu MH, Lee C.** Kinetic mechanism of protease inhibition by alpha1-antitrypsin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 15;323(2):409-15
- Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V.** The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol*. 2008;15:118-46
- Kaplan MJ, Radic M.** Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012 Sep 15;189(6):2689-95

- Karathanassis D**, Stahelin RV, Bravo J, Perisic O, Pacold CM, Cho W, Williams RL. Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J*. 2002 Oct 1;21(19):5057-68
- Katano M**, Torisu M. Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites. *Cancer*. 1982 Jul 1;50(1):62-8
- Kato T**, Noma H, Kitagawa M, Takahashi T, Oshitani N, Kitagawa S. Distinct role of c-Jun N-terminal kinase isoforms in human neutrophil apoptosis regulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Interferon Cytokine Res*. 2008 Apr;28(4):235-43
- Kim D**, Haynes CL. The role of p38-MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *Analyst*. 2013 Nov 21;138(22):6826-33
- Kim J**, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011 Feb;13(2):132-41
- Kim JE**, Chen J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes*. 2004 Nov;53(11):2748-56
- Kim MS**, Kuehn HS, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Activation and function of the mTORC1 pathway in mast cells. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):4586-95
- Kim MS**, Kuehn HS, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Activation and function of the mTORC1 pathway in mast cells. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):4586-95
- Kim SD**, Kim JM, Jo SH, Lee HY, Lee SY, Shim JW, Seo SK, Yun J, Bae YS. Functional expression of formyl peptide receptor family in human NK cells. *J Immunol*. 2009 Nov 1;183(9):5511-7
- Kjeldsen L**, Sengeløv H, Lollike K, Nielsen MH, Borregaard N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1640-9
- Kobilka BK**, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007 Aug;28(8):397-406
- Köffel R**, Meshcheryakova A, Warszawska J, Hennig A, Wagner K, Jörgl A, Gubi D, Moser D, Hladik A, Hoffmann U, Fischer MB, van den Berg W, Koenders M, Scheinecker C, Gesslbauer B, Knapp S, Strobl H. Monocytic cell differentiation from band-stage neutrophils under inflammatory conditions via MKK6 activation. *Blood*. 2014 Oct 23;124(17):2713-24
- Kolaczowska E**, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159-75
- Kono H**, Rusyn I, Yin M, Gäbele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest*. 2000 Oct;106(7):867-72
- Korchak HM**, Dorsey LB, Li H, Mackie D, Kilpatrick LE. Selective roles for  $\alpha$ -PKC in positive signaling for O-(2) generation and calcium mobilization but not elastase release in differentiated HL60 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Mar;1773(3):440-9
- Krajcovic M**, Krishna S, Akkari L, Joyce JA, Overholtzer M. mTOR regulates phagosome and entotic vacuole fission. *Mol Biol Cell*. 2013 Dec;24(23):3736-45

- Krysko DV**, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 2011 Apr;32(4):157-64
- Kuna P**, Jenkins M, O'Brien CD, Fahy WA. AZD9668, a neutrophil elastase inhibitor, plus ongoing budesonide/formoterol in patients with COPD. *Respir Med.* 2012 Apr;106(4):531-9
- Kuroki M**, O'Flaherty JT. Differential effects of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor on human neutrophil responses to chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Mar 17;232(2):474-7
- Kyriakis JM**, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):807-69
- Lacy P**. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2006 Sep 15;2(3):98-108
- Lagente V**, Planquois JM, Leclerc O, Schmidlin F, Bertrand CP. Oxidative stress is an important component of airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke or lipopolysaccharide. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 May;35(5-6):601-5
- Lai SC**, Devenish RJ. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells.* 2012 Jul 30;1(3):396-408
- Lande R**, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder JM, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007 Oct 4;449(7162):564-9
- Lang F**, Böhmer C, Palmada M, Seeböhm G, Strutz-Seeböhm N, Vallon V. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev.* 2006 Oct;86(4):1151-78
- Lapidot T**, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia.* 2002 Oct;16(10):1992-2003
- Laplanche M**, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012 Apr 13;149(2):274-93
- Lapouge K**, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol Cell.* 2000 Oct;6(4):899-907
- Lapouge K**, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):10121-8
- Lass-Flörl C**. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 2009 May;52(3):197-205.
- Le Bacquer O**, Petroulakis E, Pagliarunga S, Poulin F, Richard D, Cianflone K, Sonenberg N. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J Clin Invest.* 2007 Feb;117(2):387-96
- Le Gars M**, Descamps D, Roussel D, Sausseureau E, Guillot L, Ruffin M, Tabary O, Hong SS, Boulanger P, Paulais M, Malleret L, Belaaouaj A, Edelman A, Huerre M, Chignard M, Sallenave JM. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jan 15;187(2):170-9

- Le Y**, Hu J, Gong W, Shen W, Li B, Dunlop NM, Halverson DO, Blair DG, Wang JM. Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines. *J Neuroimmunol*. 2000 Nov 1;111(1-2):102-8
- Le Y**, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol*. 2002 Nov;23(11):541-8
- Le Y**, Oppenheim JJ, Wang JM. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001 Mar;12(1):91-105
- Leber B**, Mayrhauser U, Rybczynski M, Stadlbauer V. Innate immune dysfunction in acute and chronic liver disease. *Wien Klin Wochenschr*. 2009;121(23-24):732-44
- Lee CT**, Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel P, Weinbaum G. Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. *N Engl J Med*. 1981 Jan 22;304(4):192-6
- Lee DF**, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*. 2007
- Leevers SJ**, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Apr;11(2):219-25
- Lefkowitz RJ**. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*. 1998 Jul 24;273(30):18677-80
- Lenoir M**, Djerdjouri B, Périanin A. Stroma cell-derived factor 1alpha mediates desensitization of human neutrophil respiratory burst in synovial fluid from rheumatoid arthritic patients. *J Immunol*. 2004 Jun 1;172(11):7136-43
- Lenoir M**, Muntaner O, Pedruzzi E, Roch-Arveiller M, Tissot M, Drieu K, Périanin A. Ginkgolide B stimulates signaling events in neutrophils and primes defense activities. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 7;335(4):1149-54
- Leusen JH**, de Boer M, Bolscher BG, Hilarius PM, Weening RS, Ochs HD, Roos D, Verhoeven AJ. A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2120-6
- Li JT**, Liao ZX, Ping J, Xu D, Wang H. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol*. 2008;43(6):419-28
- Li M**, Zhao L, Liu J, Liu A, Jia C, Ma D, Jiang Y, Bai X. Multi-mechanisms are involved in reactive oxygen species regulation of mTORC1 signaling. *Cell Signal*. 2010 Oct;22(10):1469-76
- Li X**, Gao T. mTORC2 phosphorylates protein kinase C $\zeta$  to regulate its stability and activity. *EMBO Rep*. 2014 Feb;15(2):191-8
- Li Y**, Sternweis PM, Charnecki S, Smith TF, Gilman AG, Neer EJ, Kozasa T. Sites for Galpha binding on the G protein beta subunit overlap with sites for regulation of phospholipase Cbeta and adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1998 Jun 26;273(26):16265-72
- Lichtenstein A**, Seelig M, Berek J, Zigelboim J. Human neutrophil-mediated lysis of ovarian cancer cells. *Blood*. 1989 Aug 1;74(2):805-9

- Lin** CH, Yu MC, Tung WH, Chen TT, Yu CC, Weng CM, Tsai YJ, Bai KJ, Hong CY, Chien MH, Chen BC. Connective tissue growth factor induces collagen I expression in human lung fibroblasts through the Rac1/MLK3/JNK/AP-1 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):2823-33
- Lindemann** SW, Yost CC, Denis MM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Neutrophils alter the inflammatory milieu by signal-dependent translation of constitutive messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 4;101(18):7076-81
- Linnebacher** M, Maletzki C, Klier U, Klar E. Bacterial immunotherapy of gastrointestinal tumors. *Langenbecks Arch Surg*. 2012 Apr;397(4):557-68. doi: 10.1007/s00423-011-0892-6. Epub 2011 Dec 22
- Liu** L, Das S, Losert W, Parent CA. mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev Cell*. 2010 Dec 14;19(6):845-57
- Liu** P, Gan W, Inuzuka H, Lazorchak AS, Gao D, Arojo O, Liu D, Wan L, Zhai B, Yu Y, Yuan M, Kim BM, Shaik S, Menon S, Gygi SP, Lee TH, Asara JM, Manning BD, Blenis J, Su B, Wei W. Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 2013 Nov;15(11):1340-50
- Loew** D, Perrault C, Morales M, Moog S, Ravanat C, Schuhler S, Arcone R, Pietropaolo C, Cazenave JP, van Dorsselaer A, Lanza F. Proteolysis of the exodomain of recombinant protease-activated receptors: prediction of receptor activation or inactivation by MALDI mass spectrometry. *Biochemistry*. 2000 Sep 5;39(35):10812-22
- Lopez-Boado**, Y. S., Espinola, M., Bahr, S. & Belaouaj, A. Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response inducing activity. *J. Immunol*. 172, 509–515
- Lorne** E, Zmijewski JW, Zhao X, Liu G, Tsuruta Y, Park YJ, Dupont H, Abraham E. Role of extracellular superoxide in neutrophil activation: interactions between xanthine oxidase and TLR4 induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Apr;294(4):C985-93
- Lorne** E, Zhao X, Zmijewski JW, Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E. Participation of mammalian target of rapamycin complex 1 in Toll-like receptor 2-and 4-induced neutrophil activation and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Aug;41(2):237-45
- Lucey** MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*. 2009 Jun 25;360(26):2758-69
- Ma** L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. 2005 Apr 22;121(2):179-93
- Ma** XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 May;10(5):307-18
- Maddox** JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J Biol Chem*. 1997 Mar 14;272(11):6972-8
- Magnani** A, Brosselin P, Beauté J, de Vergnes N, Mouy R, Debré M, Suarez F, Hermine O, Lortholary O, Blanche S, Fischer A, Mahlaoui N. Inflammatory manifestations in a single-center cohort of patients with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Sep;134(3):655-662.e8

**Mahdaviani** SA, Mohajerani SA, Rezaei N, Casanova JL, Mansouri SD, Velayati AA. Pulmonary manifestations of chronic granulomatous disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013 Feb;9(2):153-60

**Makam** M, Diaz D, Laval J, Gernez Y, Conrad CK, Dunn CE, Davies ZA, Moss RB, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Tirouvanziam R. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 7;106(14):5779-83

**Makni-Maalej** K, Boussetta T, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. The TLR7/8 agonist CL097 primes N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: critical role of p47phox phosphorylation and the proline isomerase Pin1. *J Immunol*. 2012 Nov 1;189(9):4657-65

**Maletto** BA, Ropolo AS, Alignani DO, Liscovsky MV, Ranocchia RP, Moron VG, Pistoiresi-Palencia MC. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3094-102

**Mandal** P, Novotny M, Hamilton TA. Lipopolysaccharide induces formyl peptide receptor 1 gene expression in macrophages and neutrophils via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):6085-91

**Mandell** L, Woodhead M, Ewig S, Torres A. Respiratory infections (A Hodder Arnold Publication). Hardcover, 2006 Oct 27

**Manz** MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):302-14

**Mark** KE, Corey L, Meng TC, Magaret AS, Huang ML, Selke S, Slade HB, Tying SK, Warren T, Sacks SL, Leone P, Bergland VA, Wald A. Topical resiquimod 0.01% gel decreases herpes simplex virus type 2 genital shedding: a randomized, controlled trial. *J Infect Dis*. 2007 May 1;195(9):1324-31

**Markwick** LJ, Riva A, Ryan JM, Cooksley H, Palma E, Tranah TH, Manakkat Vijay GK, Vergis N, Thursz M, Evans A, Wright G, Tarff S, O'Grady J, Williams R, Shawcross DL, Chokshi S. Blockade of PD1 and TIM3 restores innate and adaptive immunity in patients with acute alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*. 2015 Mar;148(3):590-602.e10

**Marx** SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1995 Mar;76(3):412-7

**Massberg** S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhakov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 2010 Aug;16(8):887-96

**Masuzaki** R, Zhao SR, Csizmadia E, Yannas I, Karp SJ. Scar formation and lack of regeneration in adult and neonatal liver after stromal injury. *Wound Repair Regen*. 2013 Jan-Feb;21(1):122-30

**Mathurin** P, Duchatelle V, Ramond MJ, Degott C, Bedossa P, Erlinger S, Benhamou JP, Chaput JC, Rueff B, Poynard T. Survival and prognostic factors in patients with severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. *Gastroenterology*. 1996 Jun;110(6):1847-53

Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev*. 2004 Feb 15;18(4):423-34

- McCafferty DM.** Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut*. 2000 Mar;46(3):436-9
- McDonald PP, Cassatella MA.** Activation of transcription factor NF-kappa B by phagocytic stimuli in human neutrophils. *FEBS Lett*. 1997 Aug 4;412(3):583-6
- McGarrigle D, Huang XY.** GPCRs signaling directly through Src-family kinases. *Sci STKE*. 2007 Jun 26;2007(392):pe35
- McInturff AM, Cody MJ, Elliott EA, Glenn JW, Rowley JW, Rondina MT, Yost CC.** Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):3118-25
- McLaughlin NJ, Banerjee A, Kelher MR, Gamboni-Robertson F, Hamiel C, Sheppard FR, Moore EE, Silliman CC.** Platelet-activating factor-induced clathrin-mediated endocytosis requires beta-arrestin-1 recruitment and activation of the p38-MAPK signalosome at the plasma membrane for actin bundle formation. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):7039-50
- McMichael JW, Roghanian A, Jiang L, Ramage R, Sallenave JM.** The antimicrobial antiproteinase elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 May;32(5):443-52
- Menon S, Manning BD.** Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 2:S43-51
- Michalopoulos G, Houck KA, Dolan ML, Leutke NC.** Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res*. 1984 Oct;44(10):4414-9
- Michalopoulos GK, DeFrances MC.** Liver regeneration. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):60-6
- Miettinen HM, Gripentrog JM, Mason MM, Jesaitis AJ.** Identification of putative sites of interaction between the human formyl peptide receptor and G protein. *J Biol Chem*. 1999 Sep 24;274(39):27934-42
- Migeotte I, Riboldi E, Franssen JD, Grégoire F, Loison C, Wittamer V, Detheux M, Robberecht P, Costagliola S, Vassart G, Sozzani S, Parmentier M, Communi D.** Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. *J Exp Med*. 2005 Jan 3;201(1):83-93.
- Miller AF, Falke JJ.** Chemotaxis receptors and signaling. *Adv Protein Chem*. 2004;68:393-444
- Miller LS, Pietras EM, Uricchio LH, Hirano K, Rao S, Lin H, O'Connell RM, Iwakura Y, Cheung AL, Cheng G, Modlin RL. Inflammasome-mediated production of IL-1 $\beta$  is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Immunol*. 2007 Nov 15;179(10):6933-42
- Mócsai A, Bánfi B, Kapus A, Farkas G, Geiszt M, Buday L, Faragó A, Ligeti E.** Differential effects of tyrosine kinase inhibitors and an inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade on degranulation and superoxide production of human neutrophil granulocytes. *Biochem Pharmacol*. 1997 Oct 1;54(7):781-9
- Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G.** Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):1120-6
- Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, Ligeti E.** Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol*. 2000 Apr 15;164(8):4321-31
- Mocsai, A., M. Zhou, F. Meng, V. L. Tybulewicz, and C. A. Lowell.** 2002. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 16: 547–558.



- Mócsai A**, Zhang H, Jakus Z, Kitaura J, Kawakami T, Lowell CA. G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood*. 2003 May 15;101(10):4155-63
- Mookerjee RP**, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA, Jalan R. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology*. 2007 Sep;46(3):831-40
- Moreau R**, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V; CANONIC Study Investigators of the EASL–CLIF Consortium. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(7):1426-37, 1437.e1-9
- Moreau R**, Rautou PE. G-CSF Therapy for Severe Alcoholic Hepatitis: Targeting Liver Regeneration or Neutrophil Function?. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1424-1426.
- Moreau R**. Role of Infections in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Dig Dis*. 2015;33(4):577-81
- Moreno JA**, Ortega-Gomez A, Rubio-Navarro A, Louedec L, Ho-Tin-Noé B, Caligiuri G, Nicoletti A, Levoe A, Plantier L, Meilhac O. High-density lipoproteins potentiate  $\alpha$ 1-antitrypsin therapy in elastase-induced pulmonary emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Oct;51(4):536-49
- Morice MC**, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnàr F, Falotico R; RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002 Jun 6;346(23):1773-80
- Morishima Y.**, Ano, S., Ishii, Y., Ohtsuka, S., Matsuyama, M., Kawaguchi, M., Hizawa, N. (2013) Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. *Clin. Dev. Immunol*. 2013, 609395
- Müller S**, Straub A, Schröder S, Bauer PH, Lohse MJ. Interactions of phosphatidylinositol 3-kinase with defined G protein beta gamma-subunits. *J Biol Chem*. 1996 May 17;271(20):11781-6
- Murawaki Y**, Koda M, Yamada S, Kawasaki H, Shima H, Burkhardt H. Serum collagenase activity in patients with chronic liver disease. *J Hepatol*. 1993 Jul;18(3):328-34
- Naccache PH**, Levasseur S, Lachance G, Chakravarti S, Bourgoin SG, McColl SR. Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. *J Biol Chem*. 2000
- Nakagawa I**, Yanagawa T, Ishii T, Kakizuka A, Sztul E, Chakraborty T, Sasakawa C. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol*. 2009 Oct;11(10):1233-40
- Naschitz JE**, Slobodin G, Lewis RJ, Zuckerman E, Yeshurun D. Heart diseases affecting the liver and liver diseases affecting the heart. *Am Heart J*. 2000 Jul;140(1):111-20
- Nauseef WM**. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*. 2007 Oct;219:88-102
- Nayak BK**, Feliars D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, Fitzgerald JP, Eid A, Denapoli T, Parekh DJ, Gorin Y, Block K. Stabilization of HIF-2 $\alpha$  through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene*. 2013 Jun 27;32(26):3147-55

- Neef M**, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2006 Dec;45(6):786-96
- Neklesa TK**, Davis RW. Superoxide anions regulate TORC1 and its ability to bind Fpr1:rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):15166-71
- Neptune ER**, Iiri T, Bourne HR. Galphai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors. *J Biol Chem*. 1999 Jan 29;274(5):2824-8
- Nishikawa T**, Bell A, Brooks JM, Setoyama K, Melis M, Han B, Fukumitsu K, Handa K, Tian J, Kaestner KH, Vodovotz Y, Locker J, Soto-Gutierrez A, Fox JJ. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *J Clin Invest*. 2015 Apr;125(4):1533-44
- Nishizuka Y**. The protein kinase C family and lipid mediators for transmembrane signaling and cell regulation. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001 May;25(5 Suppl ISBRA):3S-7S
- Nojima H**, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*. 2003 May 2;278(18):15461-4
- Noubade R**, Wong K, Ota N, Rutz S, Eidenschenk C, Valdez PA, Ding J, Peng I, Sebrell A, Caplazi P, DeVoss J, Soriano RH, Sai T, Lu R, Modrusan Z, Hackney J, Ouyang W. NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity. *Nature*. 2014 May 8;509(7499):235-9
- Nusrat S**, Khan MS, Fazili J, Madhoun MF. Cirrhosis and its complications: evidence based treatment. *World J Gastroenterol*. 2014 May 14;20(18):5442-60
- O'Donoghue AJ**, Jin Y, Knudsen GM, Perera NC, Jenne DE, Murphy JE, Craik CS, Hermiston TW. Global substrate profiling of proteases in human neutrophil extracellular traps reveals consensus motif predominantly contributed by elastase. *PLoS One*. 2013 Sep 20;8(9):e75141
- O'Dowd BF**, Hnatowich M, Regan JW, Leader WM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human beta 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J Biol Chem*. 1988 Nov 5;263(31):15985-92
- Oh WJ**, Wu CC, Kim SJ, Facchinetti V, Julien LA, Finlan M, Roux PP, Su B, Jacinto E. mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J*. 2010 Dec 1;29(23):3939-51
- Ohbayashi H**. Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002 Jul;11(7):965-80
- Ohhira M**, Fujimoto Y, Matsumoto A, Ohtake T, Ono M, Kohgo Y. Hepatocellular carcinoma associated with alcoholic liver disease: a clinicopathological study and genetic polymorphism of aldehyde dehydrogenase 2. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996 Dec;20(9 Suppl):378A-382A
- Ökrös Z**, Endreffy E, Novak Z, Maroti Z, Monostori P, Varga IS, Király A, Turi S. Changes in NADPH oxidase mRNA level can be detected in blood at inhaled corticosteroid treated asthmatic children. *Life Sci*. 2012 Nov 2;91(19-20):907-11
- Oldham WM**, Hamm HE. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys*. 2006 May;39(2):117-66

**Omura T**, Yoshiyama M, Izumi Y, Kim S, Matsumoto R, Enomoto S, Kusuyama T, Nishiya D, Nakamura Y, Akioka K, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J. Involvement of c-Jun NH2 terminal kinase and p38MAPK in rapamycin-mediated inhibition of neointimal formation in rat carotid arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 Oct;46(4):519-25

**Ono K**, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000 Jan;12(1):1-13

**Ortiz-Muñoz G**, Houard X, Martín-Ventura JL, Ishida BY, Loyau S, Rossignol P, Moreno JA, Kane JP, Chalkley RJ, Burlingame AL, Michel JB, Meilhac O. HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property. *FASEB J*. 2009 Sep;23(9):3129-39

**Oshiro N**, Takahashi R, Yoshino K, Tanimura K, Nakashima A, Eguchi S, Miyamoto T, Hara K, Takehana K, Avruch J, Kikkawa U, Yonezawa K. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem*. 2007 Jul 13;282(28):20329-39

**Owen CA**, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. 1999 Feb;65(2):137-50

**Paclet MH**, Berthier S, Kuhn L, Garin J, Morel F. Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome b558 activation states. *FASEB J*. 2007 Apr;21(4):1244-55

**Palicz A**, Foubert TR, Jesaitis AJ, Marodi L, McPhail LC. Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J Biol Chem*. 2001 Feb 2;276(5):3090-7

**Papayannopoulos V**, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010 Nov 1;191(3):677-91

**Park JW**, Benna JE, Scott KE, Christensen BL, Chanock SJ, Babior BM. Isolation of a complex of respiratory burst oxidase components from resting neutrophil cytosol. *Biochemistry*. 1994 Mar 15;33(10):2907-11

**Parkos CA**, Dinanier MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT. Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1989 May 1;73(6):1416-20

**Paruch S**, El-Benna J, Djerdjouri B, Marullo S, Périanin A. A role of p44/42 mitogen-activated protein kinases in formyl-peptide receptor-mediated phospholipase D activity and oxidant production. *FASEB J*. 2006 Jan;20(1):142-4

**Patel S**, Djerdjouri B, Raoul-Des-Essarts Y, Dang PM, El-Benna J, Périanin A. Protein kinase B (AKT) mediates phospholipase D activation via ERK1/2 and promotes respiratory burst parameters in formylpeptide-stimulated neutrophil-like HL-60 cells. *J Biol Chem*. 2010 Oct 15;285(42):32055-63

**Perianin A**, Roch-Arveiller M, Giroud JP, Hakim J. Effect of acute nonimmune inflammation on locomotion of exudate and blood rabbit neutrophils. *Inflammation*. 1985 Dec;9(4):389-94

**Perianin A**, Snyderman R. Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol trisphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1989 Sep 1;143(5):1669-73

- Perry DK**, Stevens VL, Widlanski TS, Lambeth JD. A novel ecto-phosphatidic acid phosphohydrolase activity mediates activation of neutrophil superoxide generation by exogenous phosphatidic acid. *J Biol Chem*. 1993 Dec 5;268(34):25302-10
- Peters AM**, Saverymuttu SH, Bell RN, Lavender JP. Quantification of the distribution of the marginating granulocyte pool in man. *Scand J Haematol*. 1985 Feb;34(2):111-20
- Peterson TR**, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*. 2011 Aug 5;146(3):408-20
- Peyssonnaud C**, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS. HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest*. 2005 Jul;115(7):1806-15
- Phillipson M**, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2569-75
- Pick E**. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. *Small GTPases*. 2014;5:e27952.
- Pinheiro da Silva F**, Aloulou M, Skurnik D, Benhamou M, Andreumont A, Velasco IT, Chiamolera M, Verbeek JS, Launay P, Monteiro RC. CD16 promotes *Escherichia coli* sepsis through an FcR gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat Med*. 2007 Nov;13(11):1368-74
- Pinzani M**. Hepatic stellate (ITO) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. *J Hepatol*. 1995 Jun;22(6):700-6
- Pockros PJ**, Guyader D, Patton H, Tong MJ, Wright T, McHutchison JG, Meng TC. Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies. *J Hepatol*. 2007 Aug;47(2):174-82
- Ponting CP**, Kerr ID. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci*. 1996 May;5(5):914-22
- Ponziani F**, Ojetti V, Tortora A, Di Maurizio L, Purchiaroni F, Gasbarrini A. The metabolic and toxicological considerations for mTOR inhibitors in the treatment of hepatocarcinoma. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011 Dec;7(12):1535-46
- Premont RT**, Inglese J, Lefkowitz RJ. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J*. 1995 Feb;9(2):175-82
- Prossnitz ER**, Quehenberger O, Cochrane CG, Ye RD. The role of the third intracellular loop of the neutrophil N-formyl peptide receptor in G protein coupling. *Biochem J*. 1993 Sep 1;294 ( Pt 2):581-7
- Prossnitz ER**. Desensitization of N-formylpeptide receptor-mediated activation is dependent upon receptor phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997 Jun 13;272(24):15213-9
- Quinn MT**, Mullen ML, Jesaitis AJ. Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J Biol Chem*. 1992 Apr 15;267(11):7303-9
- Quinn MT**, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J Biol Chem*. 1993 Oct 5;268(28):20983-7

**Raad H**, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidallo MA, Dang PM, El-Benna J. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J*. 2009 Apr;23(4):1011-22

**Rabiet MJ**, Huet E, Boulay F. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR. *Eur J Immunol*. 2005 Aug;35(8):2486-95

**Radel SJ**, Genco RJ, De Nardin E. Structural and functional characterization of the human formyl peptide receptor ligand-binding region. *Infect Immun*. 1994 May;62(5):1726-32

**Raingeaud J**, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. 1995 Mar 31;270(13):7420-6

**Rainger GE**, Rowley AF, Nash GB. Adhesion-dependent release of elastase from human neutrophils in a novel, flow-based model: specificity of different chemotactic agents. *Blood*. 1998 Dec 15;92(12):4819-27

**Rajagopalan S**, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97(8):1916-23

**Rajkovic IA**, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology*. 1986

**Ramaiah S**, Rivera C, Arteel G. Early-phase alcoholic liver disease: an update on animal models, pathology, and pathogenesis. *Int J Toxicol*. 2004 Jul-Aug;23(4):217-31

**Ramond MJ**, Poynard T, Rueff B, Mathurin P, Théodore C, Chaput JC, Benhamou JP. A randomized trial of prednisolone in patients with severe alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*. 1992 Feb 20;326(8):507-12

**Rane MJ**, Carrithers SL, Arthur JM, Klein JB, McLeish KR. Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J Immunol*. 1997 Nov 15;159(10):5070-8

**Rankin JA**. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues*. 2004 Jan-Mar;15(1):3-17

**Rao RM**, Betz TV, Lamont DJ, Kim MB, Shaw SK, Froio RM, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Alon R, Luscinskas FW. Elastase release by transmigrating neutrophils deactivates endothelial-bound SDF-1alpha and attenuates subsequent T lymphocyte transendothelial migration. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):713-24

**Reeves EP**, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*. 2002 Mar 21;416(6878):291-7

**Regier DS**, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ, McPhail LC. Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem*. 2000 Sep 15;275(37):28406-12

**Rehm J**, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009 Jun 27;373(9682):2223-33

**Remijnen Q**, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, Vandenabeele P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*. 2011 Feb;21(2):290-304

**Remold-O'Donnell E**, Nixon JC, Rose RM. Elastase inhibitor. Characterization of the human elastase inhibitor molecule associated with monocytes, macrophages, and neutrophils. *J Exp Med*. 1989 Mar 1;169(3):1071-86

**Richardson RM**, Ali H, Tomhave ED, Haribabu B, Snyderman R. Cross-desensitization of chemoattractant receptors occurs at multiple levels. Evidence for a role for inhibition of phospholipase C activity. *J Biol Chem*. 1995 Nov 17;270(46):27829-33

**Robinson JM**, Badwey JA, Karnovsky ML, Karnovsky MJ. Release of superoxide and change in morphology by neutrophils in response to phorbol esters: antagonism by inhibitors of calcium-binding proteins. *J Cell Biol*. 1985 Sep;101(3):1052-8

**Robinson JM**, Badwey JA, Karnovsky ML, Karnovsky MJ. Cell surface dynamics of neutrophils stimulated with phorbol esters or retinoids. *J Cell Biol*. 1987 Jul;105(1):417-26

**Rocco A**, Compare D, Angrisani D, Sanduzzi Zamparelli M, Nardone G. Alcoholic disease: liver and beyond. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 28;20(40):14652-9

**Roger VL**, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2012

**Rolas L**, Makhezer N, Hadjoudj S, El-Benna J, Djerdjouri B, Elkrief L, Moreau R, Périanin A. Inhibition of mammalian target of rapamycin aggravates the respiratory burst defect of neutrophils from decompensated patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2013 Mar;57(3):1163-71

**Rosner M**, Hengstschläger M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct 1;17(19):2934-48

**Rossi F**, Romeo D, Patriarca P. Mechanism of phagocytosis-associated oxidative metabolism in polymorphonuclear leucocytes and macrophages. *J Reticuloendothel Soc*. 1972 Aug;12(2):127-49

**Rubinsztein DC**. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 2006 Oct 19;443(7113):780-6

**Rusyn I**, Yamashina S, Segal BH, Schoonhoven R, Holland SM, Cattley RC, Swenberg JA, Thurman RG. Oxidants from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase are involved in triggering cell proliferation in the liver due to peroxisome proliferators. *Cancer Res*. 2000 Sep 1;60(17):4798-803

**Sabroe I**, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK, Whyte MK. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol*. 2003 May 15;170(10):5268-75

- Saci A**, Cantley LC, Carpenter CL. Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol Cell*. 2011 Apr 8;42(1):50-61
- Säemann MD**, Haidinger M, Hecking M, Hörl WH, Weichhart T. The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *Am J Transplant*. 2009 Dec;9(12):2655-61
- Saitoh T**, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, Akira S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012 Jul 19;12(1):109-16
- Sallenave JM**, Si Tahar M, Cox G, Chignard M, Gauldie J. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1997 Jun;61(6):695-702
- Salvator H**, Mahlaoui N, Catherinot E, Rivaud E, Pilmis B, Borie R, Crestani B, Tcherakian C, Suarez F, Dunogue B, Gougerot-Pocidalo MA, Hurtado-Nedelec M, Dreyfus JF, Durieu I, Fouyssac F, Hermine O, Lortholary O, Fischer A, Couderc LJ. Pulmonary manifestations in adult patients with chronic granulomatous disease. *Eur Respir J*. 2015 Jun;45(6):1613-23
- Sancak Y**, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*. 2008 Jun 13;320(5882):1496-501
- Sarbassov DD**, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004 Jul 27;14(14):1296-302
- Sarbassov DD**, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006 Apr 21;22(2):159-68
- Sato T**, Nakashima A, Guo L, Coffman K, Tamanoi F. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene*. 2010 May 6;29(18):2746-52
- Scapini P**, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:195-203
- Schmitz F**, Heit A, Dreher S, Eisenächer K, Mages J, Haas T, Krug A, Janssen KP, Kirschning CJ, Wagner H. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J Immunol*. 2008
- Schneider-Merck T**, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, Beyer T, Lohse S, Bleeker WK, Peipp M, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, Dechant M. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol*. 2010 Jan 1;184(1):512-20
- Schreiber RE**, Prossnitz ER, Ye RD, Cochrane CG, Bokoch GM. Domains of the human neutrophil N-formyl peptide receptor involved in G protein coupling. Mapping with receptor-derived peptides. *J Biol Chem*. 1994 Jan 7;269(1):326-31
- Schroder WA**, Buck M, Cloonan N, Hancock JF, Suhrbier A, Sculley T, Bushell G. Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cell Signal*. 2007 Jun;19(6):1279-89

- Scuderi P**, Nez PA, Duerr ML, Wong BJ, Valdez CM. Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol.* 1991 Jul;135(2):299-313
- Segal AW**, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature.* 1978 Nov 30;276(5687):515-7
- Segal AW**. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223
- Sekulić A**, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* 2000 Jul 1;60(13):3504-13
- Sengelov H**, Kjeldsen L and Borregaard N (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*, 150, 1535–1543.
- Sengelov H**, Boulay F, Kjeldsen L, Borregaard N. Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J.* 1994 Apr 15;299 ( Pt 2):473-9
- Seong SY**, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jun;4(6):469-78
- Shabani F**, McNeil J, Tippet L. The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs. *Free Radic Res.* 1998 Feb;28(2):115-23
- Shapiro SD**, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163(6):2329-35
- Shaw DE**, Berry MA, Hargadon B, McKenna S, Shelley MJ, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest.* 2007 Dec;132(6):1871-5. Epub 2007 Oct 9
- Sheth P**, Seth A, Atkinson KJ, Gheyi T, Kale G, Giorgianni F, Desiderio DM, Li C, Naren A, Rao R. Acetaldehyde dissociates the PTP1B-E-cadherin-beta-catenin complex in Caco-2 cell monolayers by a phosphorylation-dependent mechanism. *Biochem J.* 2007 Mar 1;402(2):291-300
- Siller-López F**, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, Garcia J, Vera J, Gálvez J, Hernández I, Ramos M, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology.* 2004 Apr;126(4):1122-33
- Simon MI**, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 1991 May 10;252(5007):802-8
- Singh V**, Sharma AK, Narasimhan RL, Bhalla A, Sharma N, Sharma R. Granulocyte colony-stimulating factor in severe alcoholic hepatitis: a randomized pilot study. *Am J Gastroenterol.* 2014 Sep;109(9):1417-23
- Smith CW**. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993 Jan;71(1):76-87
- Smith JA**. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.* 1994 Dec;56(6):672-86



- Soejima Y**, Yanaga K, Nishizaki T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Sugimachi K. Effect of specific neutrophil elastase inhibitor on ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation. *J Surg Res*. 1999 Sep;86(1):150-4
- Soliman GA**, Acosta-Jaquez HA, Dunlop EA, Ekim B, Maj NE, Tee AR, Fingar DC. mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem*. 2010 Mar 12;285(11):7866-79
- Someya A**, Nagaoka I, Yamashita T. Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide production of guinea pig neutrophils. *FEBS Lett*. 1993 Sep 13;330(2):215-8
- Sondek J**, Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature*. 1994 Nov 17;372(6503):276-9
- Spruance SL**, Tying SK, Smith MH, Meng TC. Application of a topical immune response modifier, resiquimod gel, to modify the recurrence rate of recurrent genital herpes: a pilot study. *J Infect Dis*. 2001 Jul 15;184(2):196-200
- Stace CL**, Ktistakis NT. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1761(8):913-26
- Stahelin RV**, Burian A, Bruzik KS, Murray D, Cho W. Membrane binding mechanisms of the PX domains of NADPH oxidase p40phox and p47phox. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):14469-79
- Stallone G**, Infante B, Grandaliano G, Gesualdo L. Management of side effects of sirolimus therapy. *Transplantation*. 2009 Apr 27;87(8 Suppl):S23-6
- Stanley AJ**, MacGregor IR, Dillon JF, Bouchier IA, Hayes PC. Neutrophil activation in chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Feb;8(2):135-8
- Steelman LS**, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011 Mar;3(3):192-222
- Su SB**, Gao JI, Gong Wh, Dunlop NM, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. T21/DP107, A synthetic leucine zipper-like domain of the HIV-1 envelope gp41, attracts and activates human phagocytes by using G-protein-coupled formyl peptide receptors. *J Immunol*. 1999 May 15;162(10):5924-30
- Su SB**, Gong W, Gao JL, Shen W, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med*. 1999 Jan 18;189(2):395-402
- Sun Y**, Fang Y, Yoon MS, Zhang C, Roccio M, Zwartkruis FJ, Armstrong M, Brown HA, Chen J. Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8286-91
- Suzuki K**, Hino M, Hato F, Tatsumi N, Kitagawa S. Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha. *Blood*. 1999 Jan 1;93(1):341-9

- Suzuki T**, Chow CW, Downey GP. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1348-61
- Sweeney JF**, Nguyen PK, Omann GM, Hinshaw DB. Lipopolysaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *J Surg Res.* 1998 Jan;74(1):64-70
- Szuster-Ciesielska A**, Daniluk J, Kandefer-Szerszeń M. Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. *Med Sci Monit.* 2002 Jun;8(6):CR419-24
- Tacke RS**, Tosello-Tramont A, Nguyen V, Mullins DW, Hahn YS. Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes/macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway. *J Biol Chem.* 2011
- Taïeb J**, Delarche C, Ethuin F, Selloum S, Poynard T, Gougerot-Pocidal MA, Chollet-Martin S. Ethanol-induced inhibition of cytokine release and protein degranulation in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2002 Dec;72(6):1142-7
- Taïeb J**, Delarche C, Paradis V, Mathurin P, Grenier A, Crestani B, Dehoux M, Thabut D, Gougerot-Pocidal MA, Poynard T, Chollet-Martin S. Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol.* 2002 Mar;36(3):342-8
- Takahashi T**, Hara K, Inoue H, Kawa Y, Tokunaga C, Hidayat S, Yoshino K, Kuroda Y, Yonezawa K. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes Cells.* 2000 Sep;5(9):765-75
- Takeuchi O**, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):805-20
- Tanaka K**, Azuma A, Miyazaki Y, Sato K, Mizushima T. Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Chest.* 2012 Oct;142(4):1011-9
- Tate MD**, Deng YM, Jones JE, Anderson GP, Brooks AG, Reading PC. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7441-50
- Tato I**, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J Biol Chem.* 2011 Feb 25;286(8):6128-42
- Taylor NJ**, Manakkat Vijay GK, Abeles RD, Auzinger G, Bernal W, Ma Y, Wendon JA, Shawcross DL. The severity of circulating neutrophil dysfunction in patients with cirrhosis is associated with 90-day and 1-year mortality. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014 Sep;40(6):705-15
- Teng L**, Fan LM, Meijles D, Li JM. Divergent effects of p47(phox) phosphorylation at S303-4 or S379 on tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling via TRAF4 and MAPK in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Jun;32(6):1488-96
- Teran, L. M.**, Campos, M. G., Begishvilli, B. T., Schröder, J. M., Djukanovic, R., Shute, J. K., Church, M. K., Holgate, S. T., Davies, D. E. (1997) Identification of neutrophil chemotactic factors in bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic patients. *Clin. Exp. Allergy* 27, 396–405
- Thomas GV**, Tran C, Mellinghoff IK, Welsbie DS, Chan E, Fueger B, Czernin J, Sawyers CL. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med.* 2006 Jan;12(1):122-7

- Thomas RM**, Nauseef WM, Iyer SS, Peterson MW, Stone PJ, Clark RA. A cytosolic inhibitor of human neutrophil elastase and cathepsin G. *J Leukoc Biol*. 1991 Dec;50(6):568-79
- Thompson AA**, Elks PM, Marriott HM, Eamsamarng S, Higgins KR, Lewis A, Williams L, Parmar S, Shaw G, McGrath EE, Formenti F, Van Eeden FJ, Kinnula VL, Pugh CW, Sabroe I, Dockrell DH, Chilvers ER, Robbins PA, Percy MJ, Simon MC, Johnson RS, Renshaw SA, Whyte MK, Walmsley SR. Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates key neutrophil functions in humans, mice, and zebrafish. *Blood*. 2014 Jan 16;123(3):366-76
- Thoreen CC**, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. 2009 Mar 20;284(12):8023-32
- Tong J**, Li L, Ballermann B, Wang Z. Phosphorylation of Rac1 T108 by extracellular signal-regulated kinase in response to epidermal growth factor: a novel mechanism to regulate Rac1 function. *Mol Cell Biol*. 2013 Nov;33(22):4538-51
- Tosi MF**, Zakem H. Surface expression of Fc gamma receptor III (CD16) on chemoattractant-stimulated neutrophils is determined by both surface shedding and translocation from intracellular storage compartments. *J Clin Invest*. 1992 Aug;90(2):462-70
- Trocme C**, Deffert C, Cachat J, Donati Y, Tissot C, Papacatzis S, Braunersreuther V, Pache JC, Krause KH, Holmdahl R, Barazzzone-Argiroffo C, Carnesecchi S. Macrophage-specific NOX2 contributes to the development of lung emphysema through modulation of SIRT1/MMP-9 pathways. *J Pathol*. 2015 Jan;235(1):65-78
- Tsunawaki S**, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T. A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Mar 30;199(3):1378-87
- Tumgor G**. Cirrhosis and hepatopulmonary syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 14;20(10):2586-94
- Tumpey TM**, García-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, Pantin-Jackwood MJ, Schultz-Cherry S, Solórzano A, Van Rooijen N, Katz JM, Basler CF. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol*. 2005 Dec;79(23):14933-44
- Ueyama T**, Tatsuno T, Kawasaki T, Tsujibe S, Shirai Y, Sumimoto H, Leto TL, Saito N. A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox. *Mol Biol Cell*. 2007 Feb;18(2):441-54
- Underhill DM**, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 2002 Feb;14(1):103-10
- Vachier I**, Bonnans C, Chavis C, Farce M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. (2005) Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. *J. Allergy Clin. Immunol*. 115,55–60
- van Dam TJ**, Zwartkruis FJ, Bos JL, Snel B. Evolution of the TOR pathway. *J Mol Evol*. 2011 Oct;73(3-4):209-20
- van den Berg JM**, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, Español T, Fischer A, Kurenko-Deptuch M, Mouy R, Petropoulou T, Roesler J, Seger R, Stasia MJ, Valerius NH, Weening RS, Wolach B, Roos D, Kuijpers TW. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One*. 2009;4(4):e5234

- Vander Haar** E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.* 2007 Mar;9(3):316-23
- Veidal** SS, Karsdal MA, Vassiliadis E, Nawrocki A, Larsen MR, Nguyen QH, Häggglund P, Luo Y, Zheng Q, Vainer B, Leeming DJ. MMP mediated degradation of type VI collagen is highly associated with liver fibrosis--identification and validation of a novel biochemical marker assay. *PLoS One.* 2011;6(9):e24753
- Veverka** V, Crabbe T, Bird I, Lennie G, Muskett FW, Taylor RJ, Carr MD. Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene.* 2008 Jan 24;27(5):585-95.
- Vilar** E, Perez-Garcia J, Tabernero J. Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2011 Mar;10(3):395-403
- Vines** CM, Revankar CM, Maestas DC, LaRusch LL, Cimino DF, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Prossnitz ER. N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24;278(43):41581-4
- Vivanco** I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):489-501
- Wallach** TM, Segal AW. Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J.* 1997 Feb 1;321 ( Pt 3):583-5
- Walmsley** SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med.* 2005 Jan 3;201(1):105-15
- Walther** A, Riehemann K, Gerke V. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol Cell.* 2000 May;5(5):831-40
- Wang** W, Yan J, Wang H, Shi M, Zhang M, Yang W, Peng C, Li H. Rapamycin ameliorates inflammation and fibrosis in the early phase of cirrhotic portal hypertension in rats through inhibition of mTORC1 but not mTORC2. *PLoS One.* 2014 Jan 3;9(1):e83908.
- Wang** Z, Li J, Cho J, Malik AB. Prevention of vascular inflammation by nanoparticle targeting of adherent neutrophils. *Nat Nanotechnol.* 2014 Mar;9(3):204-10
- Wanless** IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology.* 1995 May;21(5):1238-47
- Ward** PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2004 Feb;4(2):133-42
- Weichhart** T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, Kolbe T, Stulnig TM, Hörl WH, Hengstschläger M, Müller M, Säemann MD. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity.* 2008 Oct 17;29(4):565-77
- Weichhart** T, Säemann MD. The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol.* 2009 May;30(5):218-26
- Weiner** SM, Sellin L, Vonend O, Schenker P, Buchner NJ, Flecken M, Viebahn R, Rump LC. Pneumonitis associated with sirolimus: clinical characteristics, risk factors and outcome--a single-centre experience and review of the literature. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Dec;22(12):3631-7

- Weinrauch** Y, Drujan D, Shapiro SD, Weiss J, Zychlinsky A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*. 2002 May 2;417(6884):91-4
- Weng** QP, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *J Biol Chem*. 1998 Jun 26;273(26):16621-9
- Wenzel**, S. E., Larsen, G. L., Johnston, K., Voelkel, N. F., Westcott, J. Y. (1990) Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142, 112–119
- Wenzel-Seifert** K, Seifert R. Critical role of N-terminal N-glycosylation for proper folding of the human formyl peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 14;301(3):693-8
- Werner** E. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci*. 2004 Jan 15;117(Pt 2):143-53
- Wieder** KJ, Hancock WW, Schmidbauer G, Corpier CL, Wieder I, Kobzik L, Strom TB, Kupiec-Weglinski JW. Rapamycin treatment depresses intragraft expression of KC/MIP-2, granzyme B, and IFN-gamma in rat recipients of cardiac allografts. *J Immunol*. 1993 Jul 15;151(2):1158-66
- Wiesner** R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R; United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003 Jan;124(1):91-6
- Wiest** R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2014 Jan;60(1):197-209
- Wille-Reece** U, Flynn BJ, Loré K, Koup RA, Kedl RM, Mattapallil JJ, Weiss WR, Roederer M, Seder RA. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 18;102(42):15190-4
- Williams** LT, Snyderman R, Pike MC, Lefkowitz RJ. Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Mar;74(3):1204-8
- Wilson** MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT, Williams RL. PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol Cell*. 2003 Jul;12(1):39-50
- Witko-Sarsat** V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 2000 May;80(5):617-53
- Wiza** C, Nascimento EB, Ouwers DM. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jun 15;302(12):E1453-60
- Woodruff** PG, Khashayar R, Lazarus SC, Janson S, Avila P, Boushey HA, Segal M, Fahy JV. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov;108(5):753-8
- Wyman** TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, Smith CW, England KM, Kelher M, Silliman CC. A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Dec;283(6):C1592-603

- Xie L**, Sun F, Wang J, Mao X, Xie L, Yang SH, Su DM, Simpkins JW, Greenberg DA, Jin K. mTOR signaling inhibition modulates macrophage/microglia-mediated neuroinflammation and secondary injury via regulatory T cells after focal ischemia. *J Immunol*. 2014
- Xu G**, Kwon G, Cruz WS, Marshall CA, McDaniel ML. Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2001 Feb;50(2):353-60
- Xu Y**, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*. 2007 Jul;27(1):135-44
- Xu Y**, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):111-5
- Yamauchi T**, Kaburagi Y, Ueki K, Tsuji Y, Stark GR, Kerr IM, Tsushima T, Akanuma Y, Komuro I, Tobe K, Yazaki Y, Kadowaki T. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *J Biol Chem*. 1998 Jun 19;273(25):15719-26
- Yang H**, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*. 2013 May 9;497(7448):217-23
- Yang HC**, Cheng ML, Ho HY, Chiu DT. The microbicidal and cytoregulatory roles of NADPH oxidases. *Microbes Infect*. 2011 Feb;13(2):109-20
- Yano H**, Kinoshita M, Fujino K, Nakashima M, Yamamoto Y, Miyazaki H, Hamada K, Ono S, Iwaya K, Saitoh D, Seki S, Tanaka Y. Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice and thereby improves surgical site *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun*. 2012 Dec;80(12):4409-16
- Yao H**, Edirisinghe I, Yang SR, Rajendrasozhan S, Kode A, Caito S, Adenuga D, Rahman I. Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *Am J Pathol*. 2008 May;172(5):1222-37
- Yip CK**, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell*. 2010 Jun 11;38(5):768-74
- Yokogami K**, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*. 2000 Jan 13;10(1):47-50
- Yoon MS**, Sun Y, Arauz E, Jiang Y, Chen J. Phosphatidic acid activates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase by displacing FK506 binding protein 38 (FKBP38) and exerting an allosteric effect. *J Biol Chem*. 2011 Aug 26;286(34):29568-74
- Yoon MS**, Du G, Backer JM, Frohman MA, Chen J. Class III PI-3-kinase activates phospholipase D in an amino acid-sensing mTORC1 pathway. *J Cell Biol*. 2011 Oct 31;195(3):435-47
- Yost CC**, Denis MM, Lindemann S, Rubner FJ, Marathe GK, Buerke M, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Activated polymorphonuclear leukocytes rapidly synthesize retinoic acid receptor- $\alpha$ : a mechanism for translational control of transcriptional events. *J Exp Med*. 2004 Sep 6;200(5):671-80
- Yousefi S**, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009 Nov;16(11):1438-44

**Yuo A**, Kitagawa S, Ohsaka A, Ohta M, Miyazono K, Okabe T, Urabe A, Saito M, Takaku F. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as an activator of human granulocytes: potentiation of responses triggered by receptor-mediated agonists and stimulation of C3bi receptor expression and adherence. *Blood*. 1989 Nov 1;74(6):2144-9

**Zaytseva YY**, Valentino JD, Gulhati P, Evers BM. mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2012

**Zhang F**, Zhang X, Li M, Chen P, Zhang B, Guo H, Cao W, Wei X, Cao X, Hao X, Zhang N. mTOR complex component Rictor interacts with PKC $\zeta$  and regulates cancer cell metastasis. *Cancer Res*. 2010 Nov 15;70(22):9360-70

**Zhang JY**, Zou ZS, Huang A, Zhang Z, Fu JL, Xu XS, Chen LM, Li BS, Wang FS. Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One*. 2011 Mar 1;6(3)

**Zhang W**, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, Shi J, Zheng S. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2007 Jun;39(5):1332-7

**Zhao P**, Lieu T, Barlow N, Sostegni S, Haerteis S, Korbmacher C, Liedtke W, Jimenez-Vargas NN, Vanner SJ, Bunnett NW. Neutrophil Elastase Activates Protease-activated Receptor-2 (PAR2) and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) to Cause Inflammation and Pain. *J Biol Chem*. 2015 May 29;290(22):13875-87

**Zhou Y**, Bian X, Le Y, Gong W, Hu J, Zhang X, Wang L, Iribarren P, Salcedo R, Howard OM, Farrar W, Wang JM. Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun 1;97(11):823-35

**Zhu Y**, Pires KM, Whitehead KJ, Olsen CD, Wayment B, Zhang YC, Bugger H, Ilkun O, Litwin SE, Thomas G, Kozma SC, Abel ED. Mechanistic target of rapamycin (Mtor) is essential for murine embryonic heart development and growth. *PLoS One*. 2013;8(1)

**Zimmermann M**, Aguilera FB, Castellucci M, Rossato M, Costa S, Lunardi C, Ostuni R, Girolomoni G, Natoli G, Bazzoni F, Tamassia N, Cassatella MA. Chromatin remodelling and autocrine TNF $\alpha$  are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat Commun*. 2015 Jan 23;6

**Zinzalla V**, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):757-68

**Zivkovic M**, Poljak-Blazi M, Zarkovic K, Mihaljevic D, Schaur RJ, Zarkovic N. Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10. *Cancer Lett*. 2007 Feb 8;246(1-2):100-8